

KINDER- UND JUGENDKLINIK DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK
ERNST-HEYDEMANN-STRASSE 8
18057 ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. MICHAEL RADKE

OPTIMIERUNG DER GLIOBLASTOMA MULTIFORME *IN VITRO* KULTURBEDINGUNGEN ZUR ERHALTUNG DER EGFR-AMPLIFIKATION

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. CLASSEN
KINDER- UND JUGENDKLINIK DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK
ZWEITGUTACHTERIN: PROF. DR. RER. NAT. BALTRUSCH
INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK
DRITTGUTACHTERIN: PROF. DR. MED. RUNE
INSTITUT FÜR NEUROANATOMIE, UKE HAMBURG

VORGELEGT VON:

POROSHISTA MOKRI | GEB. AM 13. AUGUST 1987 IN HEILBRONN
AUS BERLIN

ROSTOCK | 15. JUNI 2017 EINGEREICHT | 10. APRIL 2018 VERTEIDIGT

Vorabveröffentlichung der Dissertation

Teile dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Rostock in folgender Publikation veröffentlicht (under review):

William, Doreen; **Mokri, Poroshista**; Lamp, Nora; Linnebacher, Michael; Classen, Carl Friedrich; Ebersdobler, Andreas; Schneider, Björn (2017): Amplification of the EGFR gene can be maintained and modulated by variation of EGF concentrations in in vitro models of Glioblastoma multiforme

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2014 bis April 2017 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Carl Friedrich Classen in der AG Hirntumorvakzine der Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock.

Für Kiyan

Yeki bood, yeki nabood.

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)	1
1.1.1 ÄTIOLOGIE	1
1.1.2 KLASSIFIKATION	2
1.1.3 HISTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE	4
1.1.4 KLINIK UND DIAGNOSTIK	4
1.1.5 THERAPIE	5
1.1.5.1 THERAPIE NACH LEITLINIE	5
1.1.5.2 PERSONALISIERTE THERAPIEANSÄTZE	6
1.2 EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)	8
1.2.1 DEREGLATION VON EGFR BEI GLIOBLASTOMA MULTIFORME	11
1.2.2 EGFR ALS ZIEL PERSONALISierter THERAPIEANSÄTZE	13
1.3 GLIOBLASTOM-TUMORMODELLE	15
1.3.1 IN VIVO MODELLE	15
1.3.2 IN VITRO MODELLE	16
1.4 ZIELSETZUNG	18
2. MATERIAL	19
2.1 CHEMIKALIEN UND AGENZIEN	19
2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	20
2.3 GERÄTE	21
2.4 BIOCHEMISCHE KITS	23
2.5 ANTIKÖRPER	23
2.6 ZELLINIEN	23

2.7	OLIGONUKLEOTIDE	24
2.8	VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
2.9	SOFTWARE	25
3.	METHODEN.....	26
3.1	ZELLKULTUR	26
3.1.1	EXPANSION DER ZELLKULTUR.....	26
3.1.2	LANGZEITKONSERVIERUNG VON ZELLINIEN	27
3.2	HISTOLOGIE	27
3.2.1	ZELL- UND GEWEBE-EINBETTUNG	27
3.2.2	HÄMATOXYLIN UND EOSIN FÄRBUNG.....	28
3.2.3	TISSUE MICROARRAY	28
3.2.4	IMMUNHISTOCHEMIE	29
3.2.5	CHROMOGENE <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (CISH).....	29
3.3	MOLEKULARBIOLOGIE	30
3.3.1	DNA EXTRAKTION	30
3.3.2	QUANTITATIVE REAL TIME PCR	30
3.3.3	PROTEINISOLATION.....	33
3.3.4	SDS PAGE	33
3.3.5	WESTERN BLOT	33
4.	ERGEBNISSE	35
4.1	CHARAKTERISIERUNG IM VORFELD DER ARBEIT	35
4.1.1	VERIFIKATION DER GENETISCHEN IDENTITÄT DER PDX MODELLE.....	35
4.1.2	MOLEKULARPATHOLOGISCHE ANALYSEN DER PDX MODELLE.....	36
4.2	ETABLIERUNG DER ZELLINIEN	37
4.2.1	MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIEN	37
4.3	UNTERSUCHUNG DER EGFR AMPLIFIKATION	40
4.3.1	BESTIMMUNG DER EGFR KOPIEZAHL	40
4.3.2	WIEDERHERSTELLUNG DER EGFR AMPLIFIKATION	48
4.3.3	ANALYSE DER EGFR GENKOPIEN <i>IN SITU</i>	49

4.4	UNTERSUCHUNG DER EGFR PROTEINEXPRESSION	53
4.4.1	ANALYSE DER EXPRESSION DURCH IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNG	53
4.4.1.1	EGFR ANALYSE DURCH IHC	53
4.4.1.2	EGFRVIII ANALYSE DURCH IHC	56
4.4.2	WESTERN BLOT	58
5.	DISKUSSION.....	60
	LITERATURVERZEICHNIS	XII
	ANHANG	XXXVII
	THESEN	XLV
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XLV
	LEBENS LAUF	XLVII
	DANKSAGUNG	XLIX

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: ENTSTEHUNGSWEGE DES GLIOBLASTOM	3
ABBILDUNG 2: GLIOBLASTOMA MULTIFORME BEHANDLUNGSSHEMA	6
ABBILDUNG 3: SIGNALWEGE UND ANGRIFFSPUNKTE DER PERSONALISIERTEN THERAPIE	7
ABBILDUNG 4: EGFR SIGNALKASKADEN.....	10
ABBILDUNG 5: HÄUFIGE DEREGLATIONEN IM EGFR SIGNALWEG BEIM GBM.....	11
ABBILDUNG 6: DREI TEILSCHRITTE EINES REAKTIONSZYKLUS DER PCR	30
ABBILDUNG 7: PRINZIP DER REAL-TIME PCR MIT SYBR GREEN I.....	31
ABBILDUNG 8: SCHMELZKURVENANALYSE	32
ABBILDUNG 9: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON HROG33 IN P0.....	38
ABBILDUNG 10: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON HROG59 IN P0	39
ABBILDUNG 11: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON HROG22 IN P0	40
ABBILDUNG 12: QPCR ANALYSE VON HROG33	43
ABBILDUNG 13: QPCR ANALYSE VON HROG59	45
ABBILDUNG 14: QPCR ANALYSE VON HROG22	46
ABBILDUNG 15: VERGLEICHENDE QPCR ANALYSE VON HROG33 UND HROG59	47
ABBILDUNG 16: QPCR ANALYSEN NACH LIGANDENENTZUG	48
ABBILDUNG 17: 2C CISH ANALYSE DER PDX GEWEBESCHNITTE	49
ABBILDUNG 18: 2C CISH ANALYSE DER HROG33 TMAS.....	50
ABBILDUNG 19: 2C CISH ANALYSE DER HROG59 TMAS.....	51
ABBILDUNG 20: 2C CISH ANALYSE DER HROG22 TMAS.....	51
ABBILDUNG 21: 2C CISH ANALYSE DER TMAS NACH LIGANDENENTZUG	52
ABBILDUNG 22: HROG33 TMAS MIT IHC EGFR FÄRBUNG.....	54
ABBILDUNG 23: HROG59 TMAS MIT IHC EGFR FÄRBUNG.....	55
ABBILDUNG 24: HROG22 TMAS MIT IHC EGFR FÄRBUNG.....	55
ABBILDUNG 25: TMAS MIT IHC EGFR FÄRBUNG NACH LIGANDENENTZUG	56
ABBILDUNG 26: HROG33 TMAS MIT IHC EGFR VIII FÄRBUNG	57
ABBILDUNG 27: HROG33 WESTERN BLOT ANALYSE DER EGFR EXPRESSION	58
ABBILDUNG 28: HROG59 WESTERN BLOT ANALYSE DER EGFR EXPRESSION	59
ABBILDUNG 29: HROG22 WESTERN BLOT ANALYSE DER EGFR EXPRESSION	59

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: KLASSIFIKATION VON ZNS TUMOREN, MODIFIZIERT NACH RADNER <i>ET AL.</i> 2002.....	2
TABELLE 2: GLIOBLASTOMA MULTIFORME SUBTYPEN UND IHRE MARKERGENE.....	3
TABELLE 3: PERSONALISIERTE THERAPIEANSÄTZE MIT EGFR ALS ZIELSTRUKTUR	15
TABELLE 4: CHEMIKALIEN UND AGENZIEN.....	20
TABELLE 5: PUFFER UND LÖSUNGEN.....	21
TABELLE 6: GERÄTE	22
TABELLE 7: BIOCHEMISCHE KITS.....	23
TABELLE 8: ANTIKÖRPER.....	23
TABELLE 9: ZELLINIEN.....	23
TABELLE 10: OLIGONUKLEOTIDE	24
TABELLE 11: VERBRAUCHSMATERIALIEN	25
TABELLE 12: SOFTWARE.....	25
TABELLE 13: qPCR ZYKLUS MIT SYBR GREEN I	31
TABELLE 14: FINGERPRINT GENDATEN-ÜBERSICHT.....	36
TABELLE 15: EGFR AMPLIFIKATIONS RATEN DER PRIMÄRTUMOREN UND XENOGRAPHS	41
TABELLE 16: HEATMAP EGFR AMPLIFIKATION IN PASSAGE 10 IN ABHÄNGIGKEIT ZUM PDX	47

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAR	chimärer Antigen Rezeptor
CISH	Chromogene in situ Hybridisierung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle Threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRvIII	Variante III des EGFR
ERK	extracellular-signal regulated kinase (= MAPK)
et al.	et alii / aliae
f	femininum
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FKS	Fetales Kälberserum
GBM	Glioblastoma Multiforme
gDNA	genomische DNA
GFAP	Glial fibrillary acidic protein

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
hrp	horseradish peroxidase
HSR	homogenously staining region
IHC	Immunhistochemie
ID	identification
IDH1	Isozitat Dehydrogenase 1
IDH2	Isozitat Dehydrogenase 2
IL	Interleukin
IP3	Inositoltrisphosphat
Jak	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
m	masculinum
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEK	= MAPKK
MGMT	O ⁶ -Methylguanin–DNA Methyltransferase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NF1	Neurofibromin 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDX	patient derived Xenograft
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB	Proteinkinase C
PLC- γ	Phospholipase C- γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative real time PCR
Raf	= MAPKKK
Ras	Rat sarcoma protein
Rb1	Retinoblastom-Gen 1
rhEGF	recombinant human epidermal growth factor
RNA	Ribonukleinsäure
S	small
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS Page	Sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SYT1	Synaptotagmin-1
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TMA	Tissue microarray
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tris-buffered saline mit Tween 20
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
VNTR	variable number tandem repeats
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
x-Ray	Röntgenstrahlen
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
Δ	Differenz

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
-RN	Derivative Reporter
A	Ampere
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
h	Stunde
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
P	Passage
pH	pondus Hydrogenii
rpm	rounds per minute
RQ	Relative Quantification
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
V	Volt
μ	Mikro

1. EINLEITUNG

In Deutschland hat sich die Inzidenz der Tumorerkrankungen seit den 70er Jahren fast verdoppelt. Hirntumore machten dabei im Jahr 2013 1,4 % der Neuerkrankungen bei Frauen und 1,6 % bei Männern aus. Mit einer durchschnittlichen 5 Jahres Überlebensrate von nur 22,5 % zwischen 2011 und 2013 zählen sie zu den aggressiveren Tumorarten. (1) Unter den Hirntumoren machen die sogenannten gliomatösen Tumore (Gliome) etwa zwei Drittel aus. Ihre Ursprungszellen sind im glialen Stützgewebe lokalisiert. Unter den Gliomen ist die am häufigsten auftretende Tumorfamilie die der Astrozytome, welche von Astrozyten abstammen. Glioblastoma multiforme stellen die maligneste Tumorart dieser Familie mit der schlechtesten Prognose dar. (2, 3)

1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

Das GBM ist der häufigste und aggressivste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter und hat meist eine infauste Prognose. Jährlich erkranken pro 100.000 Menschen in Nordamerika 3,19 neu an GBM. Männer sind 1,6-mal häufiger betroffen als Frauen. (4–6) Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt derzeit unter Standardtherapie ca. 15 Monate, die 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 5 %. (7–10) Das mittlere Erkrankungsalter beträgt $62,2 \pm 13,4$ Jahre. Ein höheres Alter bei Diagnosestellung erhöht die Lebenserwartung und ist damit ein positiver prognostischer Marker. (6, 11) Pädiatrische Patienten mit GBM sind seltener anzutreffen, haben jedoch mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von 15-35 % eine bessere Prognose. (3, 12–14)

1.1.1 ÄTIOLOGIE

Die genauen Ursachen für die Entstehung von GBM sind weitgehend unbekannt. (15) Ein familiär gehäuftes Auftreten wird nur in 1 % der Fälle beobachtet. (9) Allerdings ist das GBM mit einigen Erkrankungen assoziiert, beispielsweise dem Retinoblastom (16), dem Zytomegalievirus (17) oder Tumorsyndromen wie dem Turcot Syndrom, dem Li-Fraumeni Syndrom oder der Neurofibromatose Typ I (15, 18–21). Bei Assoziationsstudien wurden ein geringfügig häufigeres Auftreten von Aberrationen bestimmter Risikoallele in Zusammenhang mit der Entstehung eines GBM beobachtet, wie beispielsweise ein Allelverlust des Chromosoms 9p, oder Chromosom 20q. (22) Als weitere häufig auftretende genetische Aberrationen werden der Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10 (11), oder Allelverluste auf Chromosom 13q (23), 19q (24)

oder 22q (25) angeführt. Der bislang einzige gesicherte exogene Risikofaktor ist eine Strahlenexposition des Kopfes. (9)

1.1.2 KLASSIFIKATION

Es gibt verschiedene Klassifikationsarten für Hirntumoren. Die häufigste und bekannteste ist die WHO Einteilung der Tumore des zentralen Nervensystems. Dabei werden Entitäten und Dignitäten der Tumore anhand der Histologie, Molekularpathologie, Mitoseaktivität und der Gefäßproliferation beschrieben. Diese tragen zur Diagnosefindung, Prognose und Vergleichbarkeit von Tumoren bei. Mit steigender Malignität werden die Tumore dabei einem höheren WHO-Grad zugeteilt. (26)

Da das GBM viele Kernatypien, infiltratives Wachstum und pathologische Gefäßmuster aufweist, wird es dem höchsten WHO Grad IV zugeordnet (Tab. 1). (27, 28)

Tumorfamilie	Tumorentität	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Astrozytäre Tumoren	z. B. Pilozytisches Astrozytom	0			
	z. B. Diffuses Astrozytom		0		
	Anaplastisches Astrozytom			0	
	Glioblastom				0

TABELLE 1: KLASSIFIKATION VON ZNS TUMOREN, MODIFIZIERT NACH RADNER ET AL. 2002 (27)

Histologisch werden auch Sonderformen des GBM beschrieben, wie das Kleinzell-Glioblastom, mit kleinen monomorphen rundlichen Zellen, das GBM mit oligodendroglialer Komponente, das große Ähnlichkeit mit den Oligodendrogliomen aufweist, oder Riesenzellglioblastome, mit multinukleären Riesenzellen. (26) Bei Kindern werden neben den Riesenzellglioblastomen noch das Gliosarkom und das epitheloide Glioblastom beobachtet. (29)

Das GBM kann zudem in primäres und sekundäres GBM unterteilt werden (Abb.1). Das primäre GBM (90-95 % der Fälle) entsteht *de novo* und tritt vorwiegend bei älteren Menschen auf. Das sekundäre GBM (5-10 % der Fälle) entsteht durch Differenzierung von niedriggradigen Astrozytomen und tritt häufiger bei jungen Menschen auf. (30, 31) Auch ein Astrozytomrezidiv kann als sekundäres GBM auftreten. (32)

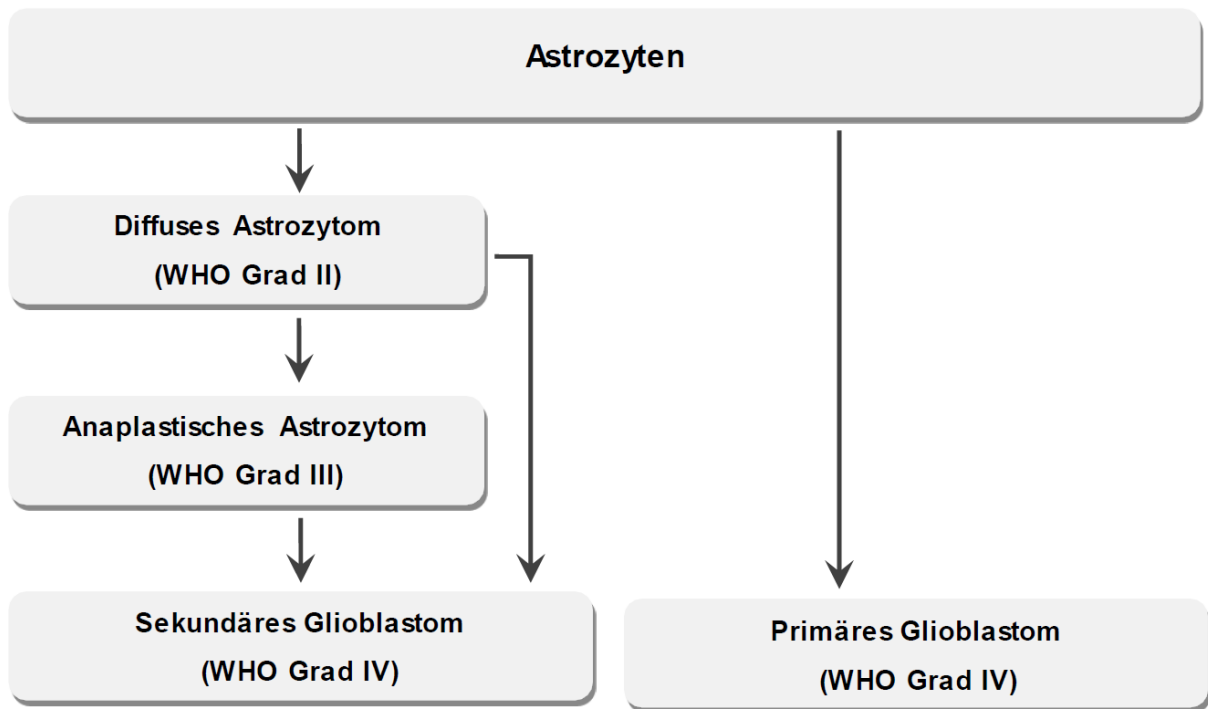


ABBILDUNG 1: ENTSTEHUNGSWEGE DES GLIOBLASTOM
EIGENE DARSTELLUNG IN ANLEHNUNG AN OHGAKI ET AL, 2004 (11)

Primäre und sekundäre GBMs weisen spezifische molekulare Eigenschaften auf. So zeigen primäre GBMs eine erhöhte EGFR-Amplifikationsrate sowie die Mutation oder Deletion des Tumorsuppressors PTEN, während sekundäre GBMs häufig p53 Mutationen aufweisen. (23, 33, 34)

Weiterhin können GBMs basierend auf dem Expressionsprofil spezifischer Markergene in 4 molekulare Subtypen unterteilt werden (Tab. 2). Durch ihre verschiedenen molekularen Modifikationen unterscheiden sich die verschiedenen Subtypen auch in ihrer Therapieresponse und der Prognose. So wird dem sogenannten proneuralen Subtyp eine bessere Prognose zugesprochen als den anderen Subtypen, allerdings auch ein schlechteres Ansprechen auf Radio- oder Radiochemotherapie. Diese Klassifizierung kann genutzt werden, um die Therapie zu individualisieren und damit zu optimieren. (35–37)

GBM Subtyp	Markergen
Mesenchymal	NF1
Neural	SYT1
Proneural	PDGFRα/IDH1
Klassisch	EGFR

TABELLE 2: GLIOBLASTOMA MULTIFORME SUBTYPEN UND IHRE MARKERGENE (36)

1.1.3 HISTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE

GBM sind histologisch charakterisiert durch eine Kern- und Zellpleomorphie sowie einer hohen Zelldichte. Die Zellvariationen reichen von kleinen undifferenzierten Rundzellen, über bipolare Zellen, bis hin zu multipolaren Zellen oder Riesenzellen. (38) Häufig werden strichförmige, verfettete Nekrosen, die dicht von Tumorzellen umgeben sind, sogenannte "Pseudopalisaden", beobachtet. Des Weiteren zeigen GBM eine hohe Vaskularisation, Blutungen und eine hohe Mitoserate. Dieses bunte Schnittbild ist für das GBM charakteristisch und sehr variabel in seiner Zusammensetzung. (38–40)

Molekularpathologisch zeigen GBMs häufig einen Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie Rb1 und p53, sowie eine verstärkte Aktivität der Signalwege, beispielsweise des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs. (41, 42) Die verstärkte Signalweg-Aktivität wird häufig durch Mutationen von Signalproteinen, wie bspw. PTEN oder durch Amplifikation von EGFR hervorgerufen. Beide sind öfter bei primären, als bei sekundären GBM anzutreffen. Auch andere Mutationen, wie bspw. von KRAS oder BRAF, werden, wenn auch weit seltener, bei GBM vorgefunden. (23, 43–46) Ein positiver prognostischer Marker des GBM ist eine reduzierte MGMT (O⁶-Methylguanin–DNA Methyltransferase) Proteinexpression, die aus einer Hypermethylierung des MGMT Promotors resultiert. Durch die verringerte Expression dieses Reparaturenzyms wird die Wirkung DNA-angreifender Chemotherapeutika verbessert. Weiterhin kommen hauptsächlich bei sekundären GBM somatische Mutationen der Isozitat Dehydrogenase 1 (IDH1) auf Chromosom 2q und IDH2 auf Chromosom 15q vor, die ebenfalls mit einer besseren Prognose einhergehen. (35, 41, 47–51)

1.1.4 KLINIK UND DIAGNOSTIK

GBM stammen aus der weißen Hirnsubstanz (52) und sind am häufigsten im Großhirn fronto-temporal lokalisiert (38). Die Tumorzellen migrieren vorwiegend an myelinisierten Bahnen entlang, auch ein bilaterales Wachstum über den Balken ist möglich. Ist dies der Fall, wird das GBM auch als Schmetterlingsgliom bezeichnet. Durch ihr infiltrierendes und destruktives Wachstum führen sie zu einer Verdrängung des umliegenden Gewebes. (38, 53) Da das GBM ein schnell wachsender Tumor ist, treten erste Symptome bereits innerhalb von 3-5 Monaten auf. Peritumoral bilden sich meist Ödeme, sodass es durch die verstärkte Raumforderung zu Fokalausfällen abhängig von der anatomischen Lage kommen kann. Hierbei erscheinen Kopfschmerzen und epileptische Anfälle als häufigste Symptome. Durch den gestörten Liquorabfluss kommt es des Weiteren zum erhöhten Hirndruck mit Übelkeit und Erbrechen. Auch führt das

GBM häufig zu einem Papillenödem, das aufgrund von symptomatischen Sehstörungen wegweisend für die Diagnosestellung sein kann. (40, 54–56)

Bildgebende Verfahren, hauptsächlich die Magnetresonanztomografie oder auch die Computertomografie, sind für die Diagnostik notwendig. Es zeigt sich meist eine stark und irregulär Kontrastmittel aufnehmende heterogene Raumforderung mit zentralen Nekrosen und perifokalem Ödem. Das Angiogramm zeigt eine starke Vaskularisierung. Eine stereotaktische Biopsie oder eine Tumoresektion mit histologischer Untersuchung führen zur Diagnosefindung. (40, 53, 54) Die histologische Begutachtung des Resektats erfolgt nach Färbung von Gewebeschnitten mit Hämatoxylin und Eosin, sowie einer immunhistochemischen Analyse von GFAP und S100 zum Nachweis der neuronalen Abstammung. Zur Sicherstellung der Diagnose werden gegebenenfalls weitere molekularpathologische Untersuchungen zur Charakterisierung des Tumors herangezogen. (40)

1.1.5 THERAPIE

Aufgrund der Bösartigkeit des GBM und der bislang meist infausten Prognose werden die Therapieoptionen in gemeinsamer Entscheidungsfindung mit dem Patienten abgewogen. (6) Stupp *et al.* haben seit 2005 mit der Verlängerung der medianen Überlebensrate um ca. 3-4 Monate durch das Zytostatikum Temozolomid die Standardtherapie bis heute maßgebend geprägt. (8, 57) Dennoch sind die Perspektiven unzureichend und die Suche nach weiteren neuen Therapiemöglichkeiten ist unabdingbar.

1.1.5.1 THERAPIE NACH LEITLINIE

Die primär kurativ intendierte Therapie des GBM, nach den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie von 2015, schließt das Bemühen um eine initiale Totalresektion des Tumors ein. Durch diffuse Infiltration des Tumors in umliegendes Hirnparenchym wird er zur besseren Visualisierung während der Operation häufig mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) fluoreszenzmarkiert. (40, 58) Die Therapie wird durch eine postoperative Bestrahlung der erweiterten Tumorregion mit 50-60 Gray in 1,8-2 Gray Fraktionen über einen Gesamtzeitraum von 6-7 Wochen ergänzt. Die Strahlendosis wird in der Tumorkavität mit einem Randsaum von 2-3 cm am höchsten angesetzt und nimmt nach außen hin ab. Konkomitant wird täglich eine Chemotherapie mit Temozolomid -entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll von Stupp *et al.* - mit 75 mg/m² Körperfläche angewandt. Nach dieser sogenannten Begleittherapie-Phase mit kombinierter Radiochemotherapie wird Temozolomid in der darauffolgenden Monotherapie-

Phase für bis zu sechs Zyklen weiter adjuvant verabreicht. Ein Zyklus hat die Dauer von 28 Tagen, wobei 150 mg bis 200 mg/m² Temozolomid an den ersten 5 Tagen des Zyklus verabreicht werden (Abb. 2). (8, 40, 57, 59, 60)

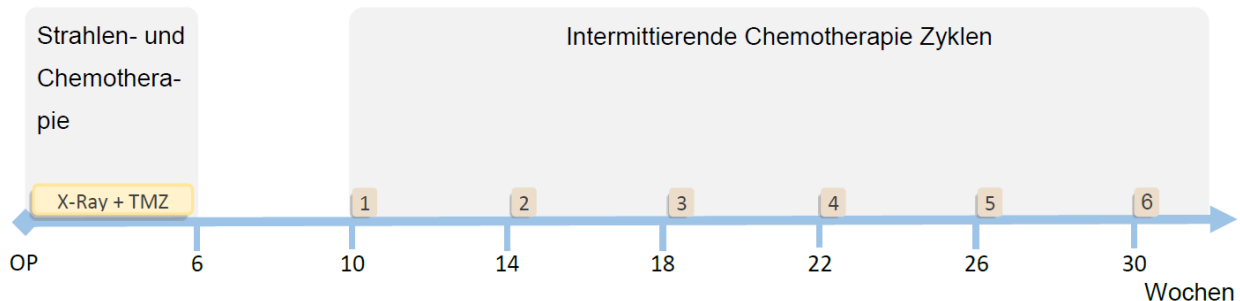


ABBILDUNG 2: GLIOBLASTOMA MULTIFORME BEHANDLUNGSSCHEMA
EIGENE DARSTELLUNG IN ANLEHNUNG AN STUPP ET AL. 2005 (1)

Bei älteren Patienten (> 60 Jahre) wird derzeit nach der Totalresektion des Tumors zwischen einer Strahlentherapie, oder einer Chemotherapie mit Temozolomid bei positivem MGMT-Status entschieden. (8, 40, 61–63) Nach einmaliger Bestimmung des MGMT-Status eines Patienten ist auch bei einem Rezidiv keine erneute Kontrolle nötig, da dieser gleich bleibt. (64) Leider wird durch die derzeitige Therapie noch viel benachbartes, normales Hirngewebe geschädigt und die Rückfallrate ist hoch. (65)

Die Therapie des Rezidivs besteht bei guter anatomischer Lage des Tumors und bei gutem Allgemeinzustand des Patienten meist aus Resektion. Adjuvant werden häufig die Zytostatika Temozolomid bzw. Vincristin verabreicht, oder es wird stereotaktische hypofraktionierte Strahlentherapie angewandt. Für die Behandlung älterer Patienten und für die Behandlung des rezidierten GBM gibt es derzeit noch kein einheitliches Therapieschema. (40, 47, 66–70)

Bei der primär palliativen Therapie kann eine Bestrahlung mit insgesamt 30-45 Gray in höheren Einzelfractionen von 2,5-3 Gray sinnvoll sein, da der Benefit der Schmerzfreiheit und der Eindämmung der Ausfallerscheinungen den Langzeitschäden durch die Nebenwirkungen überlegen ist. (61, 71, 72) Zur Linderung der ödembedingten Beschwerden können Corticosteroide zur Senkung des Hirndrucks verabreicht werden. (73)

1.1.5.2 PERSONALISIERTE THERAPIEANSÄTZE

Aufgrund der bislang unbefriedigenden Therapierbarkeit von GBM befinden sich zahlreiche personalisierte Therapieansätze in der Entwicklung. Mit dem Ziel eines besseren Therapieerfolgs

bei geringeren Nebenwirkungen soll sich die personalisierte Therapie an dem für den Patienten individuell ermittelten molekularen Profil ausrichten. (74)

Ein Ansatz stellt dabei der Einsatz spezifischer Antagonisten dar, welche gegen bestimmte Eigenschaften eines individuellen Tumors auf Basis seiner genetischen Heterogenität und seiner molekularpathologischen Gegebenheiten gerichtet sind. Diese Therapien richten sich beispielsweise gegen die in GBM häufig exprimierten Ligand-Rezeptor-Systeme, wie Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) und Epidermal growth factor receptor (EGFR), oder gegen veränderte Signalkaskademoleküle, wie Ras, Raf, Src oder mTor. (75–92) Zur Hemmung der Zellmigration und der bei GBM gesteigerten Angiogenese werden Integrine häufig Ziel spezifischer Inhibierung. (90, 93–98) (Abb. 3 und Abb. 4)

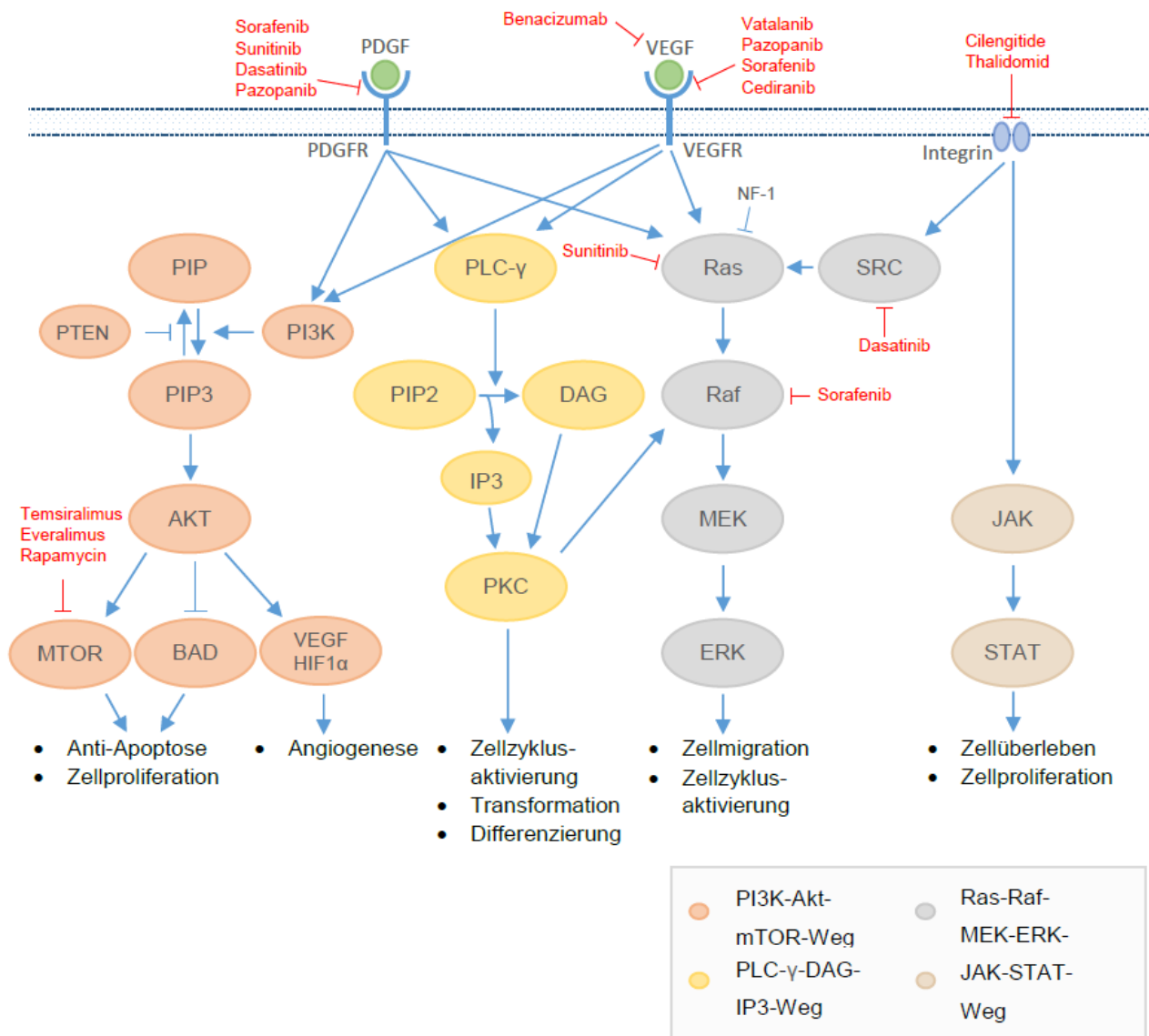


ABBILDUNG 3: SIGNALWEGE UND ANGRIFFSPUNKTE DER PERSONALISIERTEN THERAPIE
EIGENE DARSTELLUNG IN ANLEHNUNG AN WANG ET AL. 2015 (90)

Weitere vielversprechende Therapiemöglichkeiten stellt die Immuntherapie durch den Einsatz onkolytischer Viren oder durch Vakzinierungen dar. Die Strategie der aktiven Vakzinierung zielt darauf ab, das Immunsystem eines Patienten gegen den Tumor zu aktivieren. Als Antigene können Tumorzellen, Zelllysate, Peptide oder mRNA herangezogen werden. Für die Krebszelltherapie werden meist kleine Peptide als Antigene verwendet. (99–101)

Die passive Immunisierung durch direkte Antikörper Gabe ist in der klinischen Krebstherapie häufiger im Einsatz. Bei einer Fallstudie des Forschungsteams um Dr. Behnam Badie konnte 2016 ein kleiner Erfolg verbucht werden. Sie programmierten T-Zellen mithilfe von harmlosen Lentiviren so um, dass sie sich gegen IL13R α 2, einem GBM assoziierten Rezeptor, richteten. Diese sogenannten chimäre Antigen Rezeptor (CAR) exprimierenden T-Zellen wurden dann dem Patienten über Katheter zum einen direkt in die Tumorkhöhle und zum anderen auch in die Seitenventrikel appliziert, um über den Liquor auch die Metastasen zu erreichen. Der an rezidivierendem GBM erkrankte Patient konnte einen Rückgang des Tumors für 7,5 Monate nach Beginn der CAR-T-Zell-Therapie verbuchen. (102–104)

Mit dem Ziel, die Differenzierung, Transformation, Zellzyklusaktivierung und damit auch die Zellproliferation und das Zellüberleben zu hemmen und die Apoptose der malignen Zellen herbeizuführen, wurden einige verschiedene personalisierte Therapieansätze getestet. Alles in allem sind die Ergebnisse bislang nicht zufriedenstellend, der erhoffte Durchbruch blieb aus. (8, 105–107)

1.2 EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)

In den 1970er Jahren wurde der EGF-Rezeptor von Stanley Cohen zum ersten Mal beschrieben. Seit dem ist das 170 kDa große Glykoprotein einer der meist erforschten Transmembranrezeptoren. (108, 109) EGFR ist wie die bereits genannten Rezeptoren VEGFR und PDGFR eine sogenannte Rezeptortyrosinkinase. Er gehört ebenfalls zur ErbB Rezeptorfamilie und wird durch Ligandenbindung aktiviert. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung und der Rezeptor dimerisiert entweder mit einem zweiten EGFR, oder mit einem anderen Rezeptor aus seiner Familie. Die Tyrosinreste auf zytosolischer Seite des Rezeptors werden daraufhin transphosphoryliert und führen zur Aktivierung der Signalkaskade. (109, 110) Nur wenige der möglichen Liganden (EGF, TGF- α , Amphiregulin, β -Cellulin, Epiregulin und HB-EGF) sind zur Aktivierung von EGFR notwendig. (111–114)

Hauptsächlich werden vier Signalkaskaden von EGFR aktiviert (Abb. 4). Der *Ras-Raf-MEK-ERK-Weg* aktiviert gezielt Transkriptionsfaktoren, die an Zellmigration und Zellzyklusprogression beteiligte Gene aktivieren. Dies erfolgt über Translokation von ERK in den Nukleus. Die Aktivierung des *PI3K-Akt-mTOR-Wegs* führt zur Inhibierung proapoptotischer Proteine, zur

Aktivierung von mTOR, VEGF und HIF1 α . Damit geht eine Steigerung von Angiogenese und Zellproliferation einher. Beim *JAK-STAT-Weg* transloziert ein aktiviertes Protein aus der STAT-Familie in den Nukleus und reguliert direkt auf Genebene Zellüberleben und Proliferation. Jedoch kann STAT auch direkt mit dem EGFR assoziiert sein und von diesem selbst phosphoryliert und aktiviert werden. Beim *Phospholipase C- γ -DAG-IP3 Weg* hydrolysiert die aktivierte Phospholipase C- γ PIP2 in DAG und IP3. Beide zusammen aktivieren die Proteinkinase C. Daraus resultiert eine Aktivierung des Zellzyklus, Differenzierung und Transformation der Zellen. (115–121)

Um die Komplexität des EGFR und seinen Stellenwert zu begreifen, ist es wichtig nachzuvollziehen, dass sich diese Signalkaskaden über vielseitige Verflechtungen im sogenannten "crosstalk" gegenseitig beeinflussen und bedingen können. (122, 123) Innerhalb eines Zellverbands, aber auch innerhalb einer Zelle können damit verschiedene Prozesse angestoßen werden. (124)

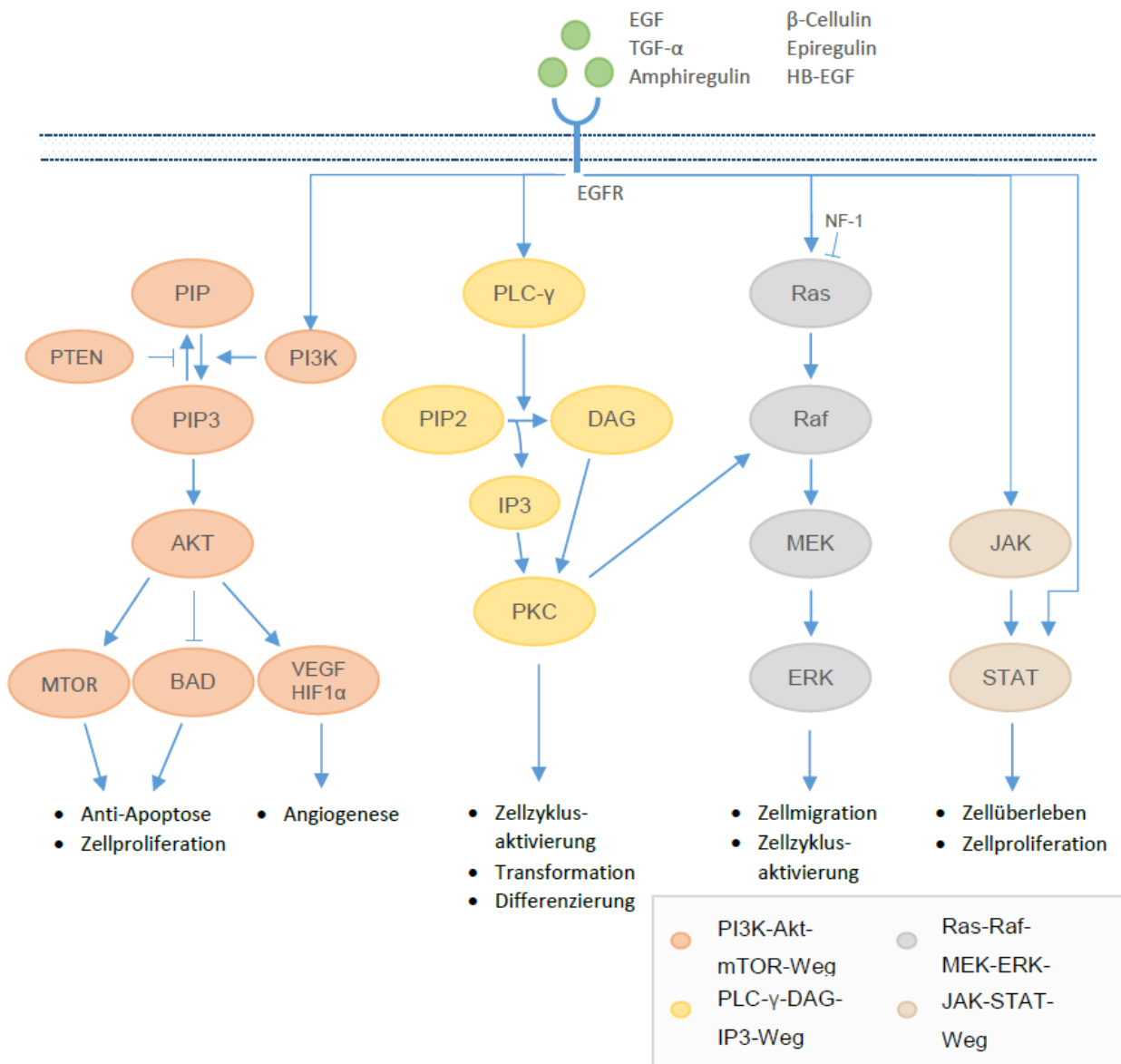


ABBILDUNG 4: EGFR SIGNALKASKADEN
EIGENE DARSTELLUNG IN ANLEHNUNG AN WANG ET AL. (90)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EGFR das Vorantreiben des Zellzyklus und die Apoptosehemmung in Epithelzellen fördert. Daraus resultiert ein wachstumsstimulierender Effekt. (125, 126) Auch in der Embryogenese und Entwicklung des zentralen Nervensystems hat der EGFR eine herausragende Rolle. Er ist bis ins Erwachsenenalter für die Proliferation, Migration, Differenzierung und das Überleben aller ZNS-Zelltypen und ihrer Vorläuferzellen verantwortlich. (127) In Krebszellen allerdings fördert die Deregulation des EGFR die Zellproliferation und das Zellüberleben und damit die Onkogenese. (125)

1.2.1 DEREGLATION VON EGFR BEI GLIOBLASTOMA MULTIFORME

GBMs weisen häufig Störungen des EGFR Signalwegs auf. Auf Rezeptorebene ist dies bedingt durch eine erhöhte Expression des Liganden oder des Rezeptors. Ein typischerweise über-exprimierter Ligand des EGFR ist TGF- α . Zur erhöhten EGFR Expression kommt es meist durch eine Amplifikation des EGFR Gens. Weiter kann der Signalweg auch unterhalb der Rezeptorebene aktiviert werden, wie beispielsweise durch PTEN oder NF-1 Inhibierung (Abb.5). (128–130)

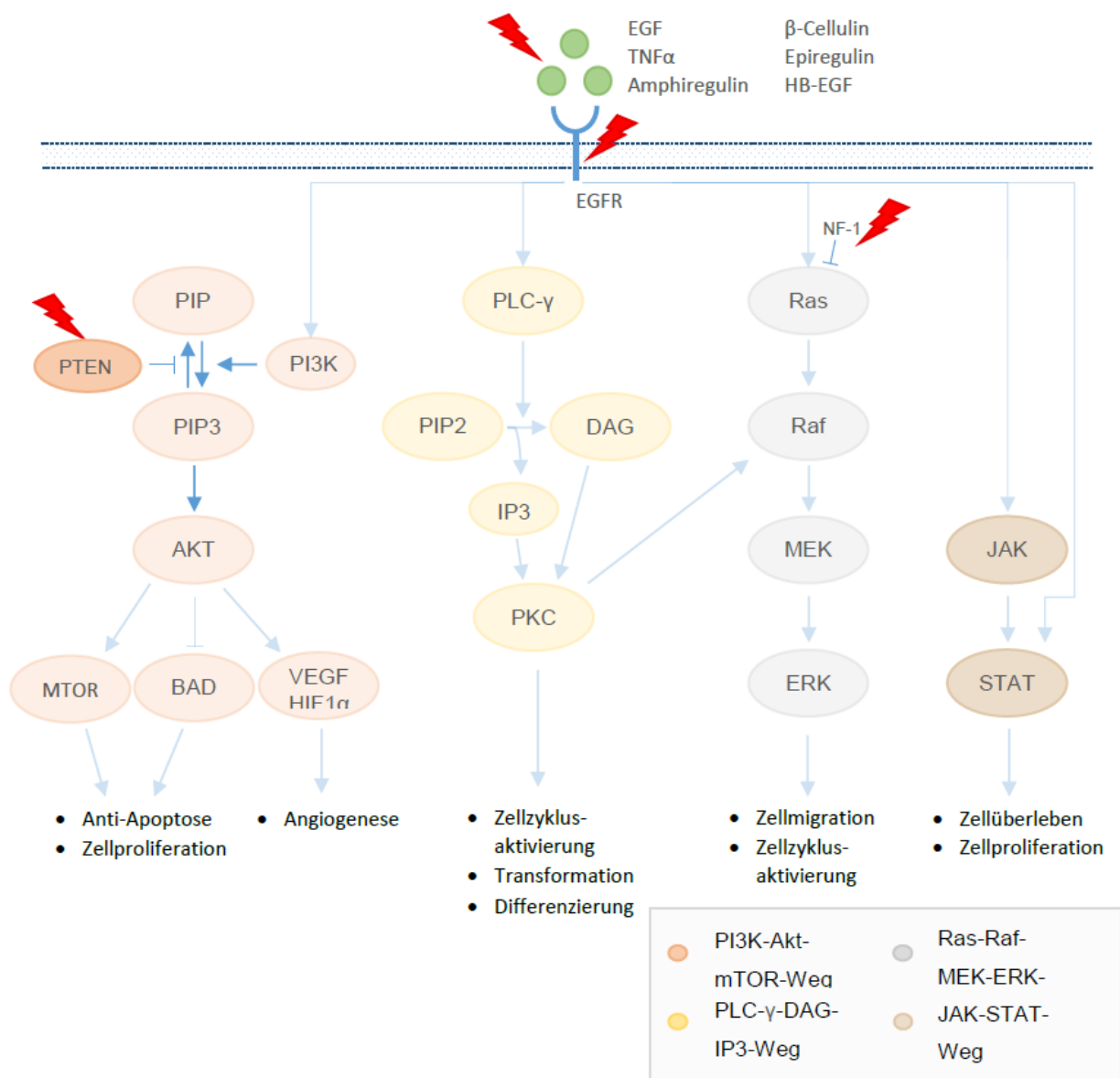


ABBILDUNG 5: HÄUFIGE DEREGLATIONEN IM EGFR SIGNALWEG BEIM GBM
EIGENE DARSTELLUNG IN ANLEHNUNG AN WANG ET AL. (90)

Bei ca. 50 % der adulten Patienten mit GBM wird eine erhöhte EGFR Amplifikationsrate vorgefunden, mit über 80-90 % vor allem in primären Glioblastomen. Die Amplifikation wird dabei entweder in allen Zellen des Tumors vorgefunden, oder in heterogener Distribution. Die zusätzlichen EGFR-Kopien können sowohl direkt auf Chromosomen, als auch hauptsächlich auf tumortypischen extrachromosomalen Bereichen lokalisiert sein. Bei chromosomaler Lokalisierung können sie, im Fall repetitiver Anordnung, in zytogenetischen Analysen als homogenously staining regions (HSRs) erscheinen. Sind Onkogene allerdings auf extrachromosomaler DNA lokalisiert, erreichen sie eine weitaus höhere Amplifikationsrate. Es wird angenommen, dass 30 % der extrachromosomalen DNA beim GBM sogenannte double minute Chromosomen darstellen. Diese sind kleine Doppelchromatinelemente, die sich von der chromosomalen DNA abgespalten haben und nur in Tumorzellen vorzufinden sind. Sie werden bei der Zellteilung zufällig an die Tochterzellen weitergegeben. Die genauen Vorgänge bei der Entstehung der double minute Chromosomen sind jedoch bislang nicht hinreichend geklärt. (131–141)

Neben der diagnostischen Relevanz des EGFR als Markergen werden GBM Patienten mit erhöhter Amplifikationsrate eine besonders schlechte Prognose und unzureichende Therapiemöglichkeiten zugesprochen. (43, 48, 142–145) Sie erhöht die Malignität des Tumors und beeinflusst damit auch Genese und Progression. (128, 145–151) Zudem hat EGFR einen Einfluss auf die Tumorentstehung, da er Zellproliferation und Zellmigration befördert und Apoptose-inhibierend wirkt. (149, 152–159) Eine erhöhte EGFR Amplifikation korreliert meist mit einer erhöhten membranösen und zytoplasmatischen EGFR Expression, aber bedingt diese nicht zwangsläufig. (33, 135, 160–162) Pädiatrische GBM Patienten besitzen allerdings ein anderes genetisches Profil als Erwachsene, dem EGFR wird dabei keine besonders große Rolle zugesprochen. So sind nur bei 0-5 % der pädiatrischen Fälle eine EGFR Amplifikation und bei ca. 25 % eine erhöhte EGFR Expression vorzufinden. (163, 164)

Bei GBM Patienten werden neben der EGFR Amplifikation auch verschiedene EGFR Mutationen gefunden. In einem GBM können dabei auch mehrere verschiedene Mutationen nachgewiesen werden. (161, 165) Die häufigste Mutation ist die EGFRvIII Mutation, bei der eine in-frame Deletion der Exons 2 bis 7 des EGFR Gens vorliegt, die in einer 267 Aminosäuren-Deletion in der extrazellulären Domäne des Proteins resultiert. Üblicherweise geht EGFRvIII mit einer EGFR Amplifikation einher, entsprechend tritt er häufiger bei primären GBM auf. (143, 146, 154–156, 158, 160, 166–170)

EGFRvIII kann keine Liganden binden, ist allerdings konstitutiv aktiv. Während der Wildtyp-Rezeptor nach Ligandenbindung sofort internalisiert und phosphoryliert wird, wird EGFRvIII nur verzögert internalisiert. Trotz konstitutiver Aktivität von EGFRvIII, erhöht ein vermehrtes Vorliegen des Liganden die Phosphorylierungsrate. Die Ursache wird in einer EGFR wt/vIII Heterodimerisierung vermutet. (170–172) Darüber hinaus aktiviert EGFRvIII verstärkt die EGFR Signalwegsproteine Ras, JNK und über das am EGFR assoziierte SHP2 die MAPK. Dies führt

zu einer im Vergleich zu EGFR stark erhöhten Proliferations- und Migrationsrate bei geringerer Apoptose. (46, 151, 160, 173–179) Über Vesikeltransfer kann die EGFRvIII Mutation an benachbarte Tumorzellen weitergegeben werden (180), auch die Angiogenese wird angeregt. (181, 182) Somit trägt die EGFRvIII Mutation zu einer verstärkten Tumorigenität bei und ist ein besonders negativer prädiktiver Marker. (156, 158, 160, 173–175, 179)

EGFRvIII kann zudem die Expression der EGFR Liganden HB-EGF und TGF- α induzieren. Dies deutet auf eine dem GBM nachgesagte Eigenschaft hin, sogenannte autokrine oder parakrine loops bilden zu können. Dabei wird der Ligand von der Rezeptor-tragenden Zelle selbst, oder einer benachbarten Tumorzelle produziert. Studien zeigten, dass Zellen mit alleiniger erhöhter EGFR Expression einen geringeren Einfluss auf die Malignität aufweisen, als Zellen mit einer zusätzlich erhöhten TGF- α Expression. Diese und viele weitere Studien führen zur Annahme, dass autokrine loops ebenfalls zur Malignität des GBM beitragen. (130, 183–189)

Da dem EGFR also eine Schlüsselrolle bei der Entstehung, dem Progress und bei der Therapierbarkeit von GBM zugesprochen wird, ist die Suche nach einer spezifischen, auf EGFR abzielenden Therapie vielversprechend.

1.2.2 EGFR ALS ZIEL PERSONALISierter THERAPIEANSÄTZE

Um die EGFR-Signalkaskade auf Rezeptorebene zu stoppen, werden Tyrosinkinase-Inhibitoren eingesetzt. Die beiden am meisten untersuchten Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib binden den Rezeptor spezifisch an der intrazellulären Domäne und inhibieren somit die Kinaseaktivität. (106, 107) Während sowohl präklinische als auch klinische Phase I Studien große Hoffnung machten, konnten diese Therapeutika in Phase II Studien bei primärem und rekurrentem GBM weder in Kombination mit der Standardtherapie oder anderen Therapeutika, noch als Monotherapie einen Vorteil beweisen. *In vitro* Studien suggerierten, dass ein erhöhter EGFR Amplifikationsstatus ein Ansprechen auf Erlotinib und Gefitinib begünstigt. Dies konnte allerdings in klinischen Studien nicht bestätigt werden. (106, 107, 190–205) Für Patienten mit rekurrentem GBM läuft derzeit eine weitere klinische Studie mit Tesevatinib, einem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation, der eine bessere Passage der Blut-Hirn-Schranke aufweist. (206, 207)

Eine EGFR-spezifische Immuntherapie kann aktiv oder passiv erfolgen. Nach dem Prinzip der passiven Immunisierung wurde versucht, durch Gabe monoklonaler, EGFR-spezifischer Antikörper eine effizientere Therapie zu gewährleisten. Ein Antikörper, der in *in vitro* Studien Ligandenbindung und Transphosphorylierung des EGFR verhindern konnte, war Cetuximab. In

klinischen Studien verbesserte Cetuximab die durchschnittliche Überlebensrate von Patienten mit kolorektalem Karzinom, zeigte jedoch keine Effektivität bei GBM Patienten. (149, 208–211) Die ersten Studien über EGFR spezifische aktive Immuntherapie wurden mit dem 14 Aminosäuren großen Peptid PepIII durchgeführt. Durch die Deletion der Exons 2-7 entsteht im Grenzbereich zwischen Exon 1 und 8 ein EGFRvIII spezifisches Neoepitop, gegen das PepIII gerichtet ist. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass Zellen mit physiologischer EGFR Expression nicht angegriffen werden. An KLH (keyhole limpet hemocyanin) konjugiert, inhibierte PepIII in Xenografts das Tumorwachstum, induzierte Apoptose und reduzierte die EGFR Phosphorylierungsrate. Zur Antigenpräsentation wurde das an KLH konjugierte Peptid an dendritische Zellen gekoppelt, um nach dem Prinzip der aktiven Immunisierung eine gesteigerte Immunreaktion gegen den GBM spezifischen Rezeptor auszulösen. (212–220)

Bei der ersten klinischen Studie, der VICTORI Studie, wurde nach der Standardtherapie den Patienten mit neu diagnostiziertem GBM das Peptid-Antigen verabreicht. Auch wenn die Patienten ein längeres progressionsfreies Intervall und Gesamtüberleben zeigten als ohne die Antikörpertherapie, wurde keine statistische Signifikanz erreicht. (221) Die darauffolgenden Phase II Studien mit *de novo* GBM Patienten waren die ACTIVATE, ACT II und ACT III Studien. Da dendritische Zellen schwer zu kultivieren und auch in der Kultivierung sehr teuer sind, wurde den Patienten PepIII-KLH mit GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) nach der Standardtherapie verabreicht. GM-CSF ist ein Glykoprotein, das als Zytokin zytotoxische T-Zellen und die Reifung der dendritischen Zellen stimuliert. Bei allen Phase II Studien verlängerte sich im Vergleich zur Standardtherapie das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Intervall und die Therapie wurde gut toleriert. Bei nach Therapie auftretenden Rezidiven wurde ein Verlust der EGFRvIII Expression beobachtet, was ein Ansprechen der Therapie gegen EGFRvIII suggerierte. (100, 222–227) Auch die ReACT Studie mit Patienten mit rekurrentem GBM zeigte bei Gabe von PepIII-KLH mit adjuvanter Bevacizumab Gabe nach Standardtherapie eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit. (228)

Trotz guter Therapieverträglichkeit und therapieinduzierter erhöhter EGFRvIII-Antikörperbildung, zeigte die anschließende doppelblind randomisierte Phase III Studie ACT IV keine klinische Verbesserung im Vergleich zur alleinigen Standardtherapie. (229) Des Weiteren wurde kritisiert, dass die fehlende EGFRvIII Expression bei einem Rezidiv nach der Immuntherapie die mutagene Wirkung der Radiochemotherapie verstärken könnte. (224)

Therapeutikum	Struktur	Stadium
Erlotinib	Tyrosinkinaseinhibitor	Präklinisch, klinisch I
Gefitinib	Tyrosinkinaseinhibitor	Präklinisch, klinisch I
Tesevatinib	Tyrosinkinaseinhibitor	Laufende klinische Studie
Cetuximab	Monoklonaler Antikörper	Präklinisch
PeplIII-KLH	Antigen	Präklinisch, klinisch I und II

TABELLE 3: PERSONALISIERTE THERAPIEANSÄTZE MIT EGFR ALS ZIELSTRUKTUR

Einen Überblick über die wichtigsten personalisierten Therapieansätze gibt Tabelle 3. Alle Versuche, EGFR und die Proteine seines Signalwegs als Ziel einer personalisierten Therapie für GBM zu nutzen, waren damit enttäuschend. Bislang ist nur die häufige Mutation EGFRvIII außerhalb klinischer Studien Ziel einer personalisierten Therapie. (40)

Erklärungsansätze für das bisherige Versagen der personalisierten Therapiestrategien sind die Heterogenität des Tumors, die inadäquate Inhibition der Zielstruktur oder die kompensatorische Aktivierung anderer Signalwege. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Blut-Hirn-Schranke, die das Heranreichen des Therapeutikums an den Tumor erschwert. (197, 199, 202, 230) Daher erscheint es umso wichtiger, Bedingungen zu schaffen, die die Untersuchung von GBM Zellen mit erhöhter EGFR Amplifikation erleichtern.

1.3 GLIOBLASTOM-TUMORMODELLE

Um GBM präklinisch besser untersuchen zu können und Therapieoptionen zu entwickeln, sind adäquate Modelle unerlässlich. Dafür müssen die spezifischen Charakteristika des Tumors im Modell bestmöglich abgebildet werden. Experimente am lebenden Organismus würden hierdurch ergänzt oder ersetzt. Deshalb wurden einige Versuche unternommen, Tumormodelle zu etablieren. Diese konnten jedoch keine befriedigende Ähnlichkeit mit dem Primärtumor aufweisen. (231–233)

1.3.1 IN VIVO MODELLE

Zum Abschluss präklinischer pharmakologischer Untersuchungen braucht es adäquate Tiermodelle, um die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung, Wirkung und Ausscheidung von Substanzen im lebenden Organismus beurteilen zu können. Um *in vivo* Tumormodelle zu

erstellen, werden Tumore entweder ins Tiermodell transplantiert, oder durch genetische Eingriffe bzw. Exposition gegenüber Karzinogenen induziert. Die gebräuchlichsten *in vivo* GBM Modelle sind murine Modelle, bei denen humanes Tumorgewebe entweder heterotop subkutan in die Flanke, oder orthotop ins Hirn transplantiert wird. Diese Modelle nennen sich Xenografts. (26, 234, 235)

Heterotope Xenografts werden standardmäßig in präklinischen onkologischen Studien eingesetzt, da das Tumorwachstum und das therapeutische Ansprechen relativ schnell untersucht werden können. Des Weiteren stellt es die Histologie und Molekularpathologie des Tumors im Patienten relativ gut dar, auch die EGFR Amplifikation kann erhalten werden. (135, 236–239) Die EGFR Amplifikationsrate kann dabei im Xenograft höher ausfallen als im ursprünglichen Primärtumor. Dies resultiert aus der vergleichsweise heterogenen Distribution der EGFR Amplifikation im Ursprungstumor. Des Weiteren weist die EGFR positive Subpopulation *in vivo* einen relativen Selektionsvorteil gegenüber der EGFR negativen auf. (240, 241)

Der Vorteil des orthotopen Xenograft-Modells besteht darin, dass eine relative Analogie zur ursprünglichen Umgebung erzeugt wird. Für die Testung neuer therapeutischer Substanzen kann dieses Modell bestmöglichen Aufschluss über Wechselwirkungen mit dem umliegenden Gewebe geben. Migration, Vaskularisation und Metastasierung eines Tumors lassen sich somit gut erforschen. (26, 234, 235, 242, 243) Auch im orthotopen Mausmodell bleibt die EGFR Amplifikationsrate erhalten. Dies könnte darin begründet sein, dass diese Mikroumgebung das humane zentrale Nervensystem besser repräsentiert. (244)

Mausmodelle sind allerdings aufgrund des notwendigen Einsatzes immunsupprimierter Mäuse und durch die Einrichtungen, die es braucht um diese zu halten, mit hohen Kosten vergesellschaftet. Auch aus bioethischen Gründen sollte der Gebrauch von Tiermodellen auf ein Minimum reduziert werden. (235)

1.3.2 IN VITRO MODELLE

Um die Rolle des EGFR beim GBM genauer darzulegen und um adäquat an EGFR-spezifischen Therapieoptionen zu forschen, sind *in vitro* Modelle des GBM, ohne zusätzliche gentechnische Veränderungen und nahe am Primarius vielversprechend. Die Vorteile der Zellkultur sind die gute Verfügbarkeit, die schnelle Zellexpansion, die Möglichkeit der Standardisierung sowie die genaue Definierbarkeit und Manipulierbarkeit. Insbesondere zu Beginn von pharmakologischen Testungen braucht es im Hochdurchsatzverfahren *in vitro* Modelle, um direkte Ergebnisse zu ermitteln und diese zu beurteilen. Zentrale Herausforderung hierbei ist die Erhaltung von tumorspezifischen geno- und phänotypischen Merkmalen.

Es hat sich gezeigt, dass serumfreie Kultivierungsbedingungen durch die Bildung von sogenannten Neurosphären den GBM Primärtumor sowohl morphologisch, als auch auf genetischer Ebene besser widerspiegeln. Auch die molekularen Subtypen bleiben im Vergleich zur Standardkultur besser erhalten und es hat sich als vorteilhafter für die Anwendung neuer therapeutischer Strategien erwiesen. (234, 240, 241, 245–254) Des Weiteren wird durch die Gabe von bFGF zum serumfreien Medium neben der Proliferationsinduktion die Differenzierung der Zellen unterdrückt und die Formation der Neurosphären unterstützt. (243, 247, 255)

Ein bisheriges Kulturartefakt ist jedoch der schnelle Verlust der EGFR Amplifikation. (168, 240, 256, 257) Nur eine Zelllinie mit erhaltener endogener EGFR Amplifikation konnte bislang erfolgreich etabliert werden. (258–260) Ein Erklärungsansatz ist der negative Selektionsdruck *in vitro*. Subpopulationen mit geringer EGFR Amplifikationsrate wachsen bevorzugt in Zellkultur, während diese mit hoher Amplifikationsrate *in vivo* ihre favorisierte Umgebung haben. (214, 257) Um die Eigenschaften des Rezeptors dennoch *in vitro* zu untersuchen, wurde bisher EGFR exogen der Zellkultur hinzugefügt. Will man jedoch das direkte Verhalten und die Abhängigkeit der Tumorzellen in Bezug auf EGFR studieren, so sind diese Modelle nicht zweckdienlich. Genetisch veränderte Modelle sind weiterhin schlecht reproduzierbar und die extrachromosomale Komponente des EGFR wird nicht berücksichtigt. (241, 261–263)

2011 konnten Stockhausen *et al.* jedoch mit serumfreier Kultur und dem Zusatz von 10 ng/ml EGF die EGFR Amplifikation über mehrere Passagen *in vitro* erhalten, auch wenn die Rate im Vergleich zum Xenograft geringer war. (241)

Schulte *et al.* hingegen waren erfolgreich mit EGF Entzug. Zwei Zelllinien behielten die Amplifikation über 20 Passagen, auch wenn die relative Amplifikationsrate bei einer auf unter ein Viertel des ursprünglichen Wertes des Primärtumors gefallen war. Zur Überprüfung der Stabilität wurde dann einer der serumfrei und ohne EGF kultivierten Zelllinien, die erhöhte EGFR Amplifikation aufwies, daraufhin 10 Wochen lang 10 ng/ml EGF zum Medium zugeführt. Die Amplifikationsrate blieb dennoch erhalten. Auch einer mit 10 ng/ml EGF kultivierter Zelllinie, die eine verlorene Amplifikationsrate aufwies, wurde der Ligand entzogen, ohne dass dadurch die Amplifikation wiedererlangt wurde. (264) Andererseits beobachteten Mazzoleni *et al.*, dass EGFR negative Zellen bei Reduktion der Ligandenkonzentration von 20 ng/ml auf 5 ng/ml wieder EGFR exprimieren konnten. (265)

Auch bei anderen Studien wurde bei Erhöhung der EGF Konzentration im serumfreien Medium ein schneller Abfall der EGFR Amplifikationsrate beobachtet. Weitere Einflüsse des EGF auf die Zellkultur waren eine verminderte Proliferationsfähigkeit und vermehrtes Zellsterben. (264, 266–269) Des Weiteren wird angenommen, dass die Morphologie der Zellen durch die EGF induzierte Sphärenausbildung beeinflusst wird. (251)

1.4 ZIELSETZUNG

Trotz moderner operativer Verfahren und großem Fortschritt in der GBM-Therapie durch Temozolomid (7, 8, 59) ist die Erfolgsrate unbefriedigend. Da die bisherigen Bemühungen der personalisierten Therapie erfolglos waren, wird deutlich, dass neben der Definierung von pathologischen Signalwegen die Funktionen und Wechselwirkungen der Signalwege in GBM Zellen ermittelt werden müssen. (270–272)

Dafür bieten sich *in vitro* Modelle an, die auch langfristig möglichst reale Bedingungen widerspiegeln sollen. Durch die Fortschritte der Genotypisierung kann die Tumorarchitektur erfasst werden und Modelle nahe am Primarius, ohne zusätzliche gentechnische Veränderungen und mit gleichen molekularen Eigenschaften nachgebildet werden. (152, 273–276)

Ein grundsätzliches *in vitro*-Artefakt ist der schnelle Verlust der EGFR Genamplifikation. (168, 240, 256, 257, 277) Die EGFR Amplifikation ist in 50 % aller GBM Fälle vorzufinden und geht mit einer erhöhten Malignität einher. Um weitere Untersuchungen in Bezug auf Amplifikationsstatus, Mutationen und die daraus resultierenden Therapieoptionen vornehmen zu können, ist es wichtig, ein adäquates Tumormodell mit erhaltener EGFR Amplifikationsrate zu etablieren. (265) Erste positive Ergebnisse konnten Stockhausen *et al.* und Schulte *et al.* mit ihren veränderten Kulturbedingungen im serumfreien Medium mit 10 ng/ml EGF (241) und ohne EGF (264) erzielen. Daher lag die Vermutung nahe, dass die EGF Konzentration als Stellschraube in der Zellkultur einen Einfluss auf die EGFR Amplifikationsrate nehmen kann.

Ziel dieser Arbeit ist es daher zu untersuchen, ob (1) geringe EGF Konzentrationen in serumfreiem Medium dazu beitragen, eine GBM Zelllinie mit einer über mehrere Passagen erhaltenen EGFR Amplifikationsrate zu etablieren. Zudem soll (2) analysiert werden, inwieweit die EGFR Amplifikation von der EGF Konzentration abhängig ist und sich dementsprechend durch Änderung der Ligandenkonzentration manipulieren lässt. Des Weiteren haben Schulte *et al.* und Mazzoleni *et al.* kontroverse Ergebnisse bei der Betrachtung der Stabilität der Zellkultur erzielt. (264, 265) Daher soll (3) die Regenerierbarkeit einer durch hohe EGF Konzentration im serumfreien Medium abhandengekommener EGFR Amplifikation untersucht werden.

2. MATERIAL

2.1 CHEMIKALIEN UND AGENZIEN

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
B27 (50x)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Dako, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DFS-Taq-Polymerase	Bioron diagnostics, Ludwigshafen, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Dithiothreitol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
gDNA, human	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %, vergällt	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälber Serum FKS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fixogum	Marabu GmbH, Tamm, Deutschland
Formafix 4 %	Grimm, Torgelow, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Fluka Honeywell, Mosbach, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kalilaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Methanol	J.T Baker/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natrium-Iodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland

MATERIAL

Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Protease Inhibitor Mini Tablets	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein Größenstandard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
rhEGF	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RIPA-Lysepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tween20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin, Deutschland

TABELLE 4: CHEMIKALIEN UND AGENZIEN

2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN

Lösung	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver in TBS
10x Tris-buffered saline (TBS)	60,57 g Tris
pH-Wert 7,5	43,83 g NaCl
	500 ml H ₂ O
1x TTBS	100 ml 10x TBS
	1 ml Tween20
	1 l H ₂ O
Einfriermedium	5 ml DMSO
	45 ml FKS
Hämalaun-Lösung	Hämatoxylin
	Kalilaun
	Natrium-Iodat
Laemmli Puffer	100 mg SDS
	15 mg Dithiothreitol
	2,5 ml 0,5M Tris/HCl
	1,15 ml Glycin
	10-20 Tropfen Bromphenolblau
	(1 % in 96 % Ethanol)

MATERIAL

Lysepuffer	RIPA
	Proteaseinhibitor
Standardmedium	DMEM Ham`s F12
	2 mM L-Glutamin
	10 % FKS
Serumfreies Medium	DMEM Ham`s F12
	2 mM L-Glutamin
	1x B27
	10 ng/ml bFGF
	0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 10; 30 ng/mL rhEGF
Sammelgel-Puffer pH 6,8	0,5 M Tris/HCl
Trenngel-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris/HCl
Laufpuffer 10x pH 8,3	0,25 M Tris
	2 M Glycin
	HCl
	2,5 g SDS
10 % SDS	10 g SDS
	100 ml H ₂ O
10 % Ammoniumpersulfat	1 g Ammoniumpersulfat
	10 ml H ₂ O
Anodenpuffer 1 pH 10,4	300 mM Tris/Hcl
	20 % Ethanol
Anodenpuffer 2 pH 10,4	30 mM Tris/HCl
	20 % Ethanol
Kathodenpuffer pH 9,4	40 mM 6-Aminohexansäure
	25 mM Tris/HCl
	20 % Ethanol

TABELLE 5: PUFFER UND LÖSUNGEN

2.3 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec, Münster, Deutschland
Blotsystem	TE70x semi-dry transfer unit, Höfer, Sulzbach, Deutschland
Brutschrank	INCO2246, Memmert, Schwabach, Deutschland

Einbettungsgerät	Excelsior AS System, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Einfriercontainer	Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektrische Pipettier- hilfe	Pipetboy, Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Fotomikroskop	Olympus BX53 Kamera Olympus DP72, Olympus, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank -28 °C	Premium NoFrost, Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	VIP series Sanyo, Moriguchi, Japan
Geldokumentation	GelLogic 1500 Imaging System, Kodak, Berlin, Deutschland
Handstückzähler	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Heizblock	CHB-202, Bioer, Hangzhou, China
Horizontalschüttler	Rotamax 120, Heidolph, Schwabach, Deutschland
Hybridisierungs- ofen, INCU-Line IL23	VWR International Darmstadt, Deutschland
IHC-System	Autostainer Link 48, Dako, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Laufkammer	MightySmall II, Höfer, Sulzbach, Deutschland
Microplate Reader	Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikropipetten (10; 20; 200; 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	CK40, Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Multistep Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-System	StepOne Realtime PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Spannungsquelle	BluePower500, Serva, Heidelberg, Deutschland
Spectrophotometer	NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	Safemate 1.8 Vision, EuroClone, Pero, Italien
Tischzentrifuge	Mikro200, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Manual Tissue Arrayer	MTA-1, Beecher Instruments, Sun Prairie, USA
Vakuum Absaugsystem	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Waage	Alt 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutsch- land
Wärmeplatte	Präzitherm, StörkTronic, Stuttgart, Deutschland
Zählkammer	Neubauer, Marienfeld, Deutschland
Zentrifuge	Rotanta 460R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland

TABELLE 6: GERÄTE

2.4 BIOCHEMISCHE KITS

Kit	Hersteller	Gebrauch
BCA Assay Kit	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	Proteinkonzentrationsbestimmung
EnVision FLEX Visualisation Systems	Dako, Hamburg, Deutschland	Immunhistochemie
SensiFastSYBR Hi-Rox-Kit	Bioline, Luckenwalde, Deutschland	qPCR
Super Signal West Femto KIT	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Western Blot
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	DNA Extraktion
ZytoDot 2C SPEC EGFR/CEN 7 Probe	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland	CISH

TABELLE 7: BIOCHEMISCHE KITS

2.5 ANTIKÖRPER

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Maus αEGFR (Klon 3G143)	1:20	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Maus αEGFRVIII	1:200	Biorbyt, Cambridge, United Kingdom
Maus α-β-Actin	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Kaninchen α-Maus-hrp	1:1000	Antibodies-online.com, Aachen, Deutschland
Ziege α-Kaninchen-hrp	1:1000	Antibodies-online.com, Aachen, Deutschland

TABELLE 8: ANTIKÖRPER

2.6 ZELLINIEN

Zelllinie	Herkunft	Zelltyp
HROG22	Human	Primäre GBM Zellen aus PDX
HROG33	Human	Primäre GBM Zellen aus PDX
HROG59	Human	Primäre GBM Zellen aus PDX

TABELLE 9: ZELLINIEN

2.7 OLIGONUKLEOTIDE

Genort	Forward Primer	Reverse Primer	Hersteller
EGFR	5'-TCCCATGAT- GATCTGTCCCTCACA-3'	5'-CAGGAAAAT- GCTGGCTGACCTAAG- 3'	biomers.net, Ulm, Deutschland
LINE 1	5'-TGCTTTGAAT- GCGTCCCAGAG-3'	5'-AAAGCCGCTCA- ACTACATGG-3'	biomers.net, Ulm, Deutschland

TABELLE 10: OLIGONUKLEOTIDE

2.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blottingpapier	Whatman/Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dakopen	Dako, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einweg- Skalpell	Dahlhausen, Köln, Deutschland
Einbettkassette	KABE Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland
Handschuhe latexfrei, puderfrei S	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Optical-Clear Klebefolien	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Petrischalen (100 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10;20;200;1000 µl) steril (mit und ohne Filter)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polypropylenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
PVDF Membran	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Serologische Pipetten (2;5;10 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Filter 75 cm ³	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb 70 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96Well-PCR-Platte	96Well Multiply Half-Skirt, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96Well-PCR-Platte	ThermoSprint Plate 96, Biatec, Märstetten, Schweiz

96Well-PCR-Platte	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
96Well-Platte (U-Form, unsteril)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

TABELLE 11: VERBRAUCHSMATERIALIEN

2.9 SOFTWARE

Software	Hersteller	Anwendung
StepOne V2.1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland	qPCR
Citavi 5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz	Zitierprogramm
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmont, USA	Auswertung
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmont, USA	Dissertationsschrift
Adobe Acrobat Reader	Adobe Systems, Dublin, Ireland	Dissertationsschrift
NanoDrop Spectrometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	DNA Konzentrationsbestimmung
Molecular Imaging Software	Kodak, Berlin, Deutschland	Western Blot Visualisierung
CellSens Dimension 1.5 Software	Olympus, Hamburg, Deutschland	Immunhistochemie
Magellan v7.2	Tecan, Männedorf, Schweiz	Protein Konzentrationsbestimmung

TABELLE 12: SOFTWARE

3. METHODEN

3.1 ZELLKULTUR

Bei der Zellkultur werden Zellen in verschiedenen Nährmedien *in vitro* kultiviert. Dabei werden Zellen einer Gewebeart, die sich in Zellkultur unbegrenzt teilen, als Zelllinie bezeichnet.

3.1.1 EXPANSION DER ZELLKULTUR

Ausgehend von patientenindividuellen GBM Gewebeproben wurden zuvor im eigenen Labor die patient derived Xenograft (PDX)-Modelle HROG22, HROG33 und HROG59 etabliert. Die Prozedur erfolgte nach schriftlich erklärtem Einverständnis der Patienten, sowie auf der Grundlage eines zustimmenden Votums der Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock (Referenznummer: A 2009/34).

Aus diesen PDX-Modellen wurden Zelllinien etabliert. Diese wurden entweder in Standardmedium (DMEM/Ham's F12, 2 mM L-Glutamin, 10 % FKS), oder in serumfreiem Medium (DMEM/Ham's F12, B27, 10 ng/ml bFGF, verschiedene Konzentrationen EGF) kultiviert. Dafür wurde das Tumorgewebe mit einem sterilen Skalpell in einer Petrischale fein zerkleinert und durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gespült. Die Einzelzellsuspensionen wurden zu gleichen Teilen unter allen Kulturbedingungen (Standardmedium mit 10 % FKS, serumfreies Medium mit 0 ng/ml; 0,5 ng/ml; 1 ng/ml; 1,5 ng/ml; 2 ng/ml; 2,5 ng/ml; 10 ng/ml oder 30 ng/ml EGF) ausgesät. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Adhärent wachsende Zelllinien wurden passagiert, sobald die Kulturflaschen konfluent bewachsen waren. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült, und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA Lösung vom Boden der Kulturflasche gelöst. Bei in Suspension wachsenden Zelllinien erfolgte die Teilung nach Sphäroidbildung mechanisch durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (5 min, 300 x g, RT), der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert.

Das Medium wurde regelmäßig erneuert, um die Konzentration von rhEGF so konstant wie möglich zu halten. Alle Arbeitsschritte wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt, alle Geräte wurden vor dem Gebrauch desinfiziert oder autoklaviert.

3.1.2 LANGZEITKONSERVIERUNG VON ZELLINIEN

Zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen erfolgte die Kryokonservierung bei -80 °C. Dabei werden alle Stoffwechselvorgänge eingestellt und die Vitalität der Zellen wird zu einem gewissen Anteil erhalten. Durch langsames Abkühlen und durch die Zugabe von Schutzmitteln wird die Überlebensrate der Zellen erhöht.

Die einzufrierenden Zellen wurden, wie unter 3.1.1. beschrieben, geerntet und zentrifugiert (5 min, 300 x g, RT). Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Einfriermedium (FKS mit 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer bei -80 °C mit einer Absenkung der Temperatur um 1 °C/min eingefroren. Kryokonservierte Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort mit PBS gewaschen. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 300 x g, RT) und der Abnahme des Überstandes wurden sie in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche ausgesät.

3.2 HISTOLOGIE

Bei der histologischen Untersuchung wird die Mikrostruktur des Gewebes durch verschiedene Färbemethoden sichtbar gemacht und anschließend betrachtet.

3.2.1 ZELL- UND GEWEBE-EINBETTUNG

Um das Gewebe histologisch zu untersuchen, muss es fixiert und in feine Schnitte geschnitten werden. Die Fixierung ist notwendig, um das Gewebe möglichst in seiner physiologischen Form zu erhalten und die enzymatische Autolyse zu stoppen. Nach der Fixierung muss das Gewebe zur Weiterverarbeitung in ein Medium eingebettet werden. In der Routinediagnostik hat sich die Paraffineinbettung nach Formalinfixierung (FFPE-Gewebe) durchgesetzt.

Nach dem Ernten wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und anschließend in neutral gepuffertem Formalin (4 %) fixiert. Dieses wirkt quervernetzend und wenig denaturierend, wodurch die natürliche Form der Zellen gut erhalten wird. Um das Gewebe dann vom hydrophilen Formalin ins hydrophobe Paraffin zu überführen, wurde es zunächst mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 % Ethanol) dehydratisiert. Das Gewebe wird dabei sekundärfixiert. Nach der Dehydratation wurde das Gewebe beim sogenannten Clearing

in RotiHistol gegeben, das sowohl mit Alkohol, als auch mit Paraffin mischbar ist. Dadurch wird das Gewebe von Wasser oder Alkohol befreit, wodurch sich seine Schnittfestigkeit erhöht. Daraufhin erfolgte das Einbetten des Gewebes in Paraffin im Excelsior AS System nach Standardprotokoll. Das Paraffin wurde dabei durch Erhitzen bis zum Schmelzpunkt (ca. 52-60 °C) verflüssigt. Nach der Infiltration des Gewebes mit Paraffin bis zur Sättigung wurde durch Temperatursenkung der Paraffin-Gewebe-Block erhärtet. Für weitere Analysen wurden Gewebeschnitte von 3-5 µm Dicke mithilfe eines Mikrotoms erstellt.

3.2.2 HÄMATOXYLIN UND EOSIN FÄRBUNG

Die Hämatoxylin und Eosin-Färbung ist eine Routine Übersichtsfärbung um den Kontrast der Zellen zu erhöhen. Dadurch kann die Zellmorphologie lichtmikroskopisch dargestellt werden. Die Zellkerne sind insgesamt negativ geladen und damit basophil. Sie ziehen den basischen Farbstoff Mayers Hämalaun über Ionenbindung an und erscheinen dadurch blau. Zytoplasma und Bindegewebe besitzen eine positive Gesamtladung und lassen sich durch saure Farbstoffe wie Eosin färben. Infolgedessen erscheinen sie rosa.

Vor der Färbung wurden die Schnitte in Clearing Lösung gegeben, um das Gewebe zu entparaffinieren. Danach wurde in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. rehydriert. Die Färbung erfolgte zunächst 10 min in Hämalaun Lösung, die Schnitte wurden dann kurz unter Leitungswasser gespült. Danach wurden sie 2 min mit Eosin gegengefärbt und wiederum unter Leitungswasser kurz abgespült. Mit aufsteigender Ethanolreihe wurden die Schnitte wieder dehydratisiert. Nach dem Clearing in RotiHistol wurden sie mit Mounting Medium und einem Deckgläschen eingedeckt.

3.2.3 TISSUE MICROARRAY

Zelllinien wurden vor der Paraffin-Einbettung mit Hämalaun angefärbt, um sie für die TMA-Herstellung besser visualisieren zu können. Mit dem Manual Tissue Arrayer MTA-1 wurden Tissue microarrays (TMAs) hergestellt. Vom Donor-Block wurden dabei 3 Zylinder gestanzt und in einen Akzeptor-Block transferiert. Der Block wurde auf 50 °C erhitzt und die korrekte Platzierung der Stanzen wurde lichtmikroskopisch validiert. Nach der Temperaturniedrigung war der Block erhärtet.

3.2.4 IMMUNHISTOCHEMIE

Mit immunhistochemischen Methoden werden Proteine via Antikörper-Antigenreaktion visualisiert und gegebenenfalls auch durch direkten Vergleich quantifiziert. Ein spezifischer Primärantikörper wird mit einem entsprechenden Sekundärantikörper auf das zu untersuchende Gewebe gegeben. Der Sekundärantikörper weist die Existenz und Bindung des Primärantikörpers an das Antigen nach. Der Sekundärantikörper ist Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. HRP katalysiert die Umwandlung von 3,3'-Diaminobenzidin unter Verbrauch von H_2O_2 zu einem braunen Farbstoff. An den Stellen, an denen die gesuchten Proteine im Gewebe vorhanden sind, wird das braune Signal dargestellt.

Die Immunhistochemie-Färbung wurde an TMA-Schnitten mit dem Autostainer link 48 nach Routineprotokoll durchgeführt. Gefärbt wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin, gegengefärbt mit Hämatoxylin.

3.2.5 CHROMOGENE *IN SITU* HYBRIDISIERUNG (CISH)

Mit der 2 coloured chromogenen *in situ* Hybridisierung (2C CISH) können spezifische DNA-Sequenzen in der Interphase in histologischen Präparaten visualisiert werden. Eine komplementäre markierte Sonde bindet an die spezifische Sequenz und diese wird durch eine Farbreaktion lichtmikroskopisch sichtbar gemacht.

Das EGFR Gen wurde mit dem ZytoDot 2C SPEC EGFR/CEN 7 Probe Kit, mithilfe markierter DNA-Sonden durch chromogene *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Die Objektträger wurden nach Herstellerangaben vollständig von Paraffin gelöst und durch Inkubation mit Pepsin von Proteinen befreit, um die DNA für die Sonde zugänglich zu machen. Mit einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Schnitte dehydratisiert und danach an der Luft getrocknet. Anschließend wurden 10 µl Sonde aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Danach wurde die DNA durch Hitze denaturiert (5 min, 78-80 °C) und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C mit den Sonden, die zum EGFR-Gen bzw. dem Zentromer des Chromosoms 7 als interne Kontrolle komplementär sind, hybridisiert. Am nächsten Tag wurde das Deckglas entfernt und die Zellen nach Herstellerangaben gewaschen. Die Antikörper Anti Dig/DNP-Mix wurden aufgetragen. Nach wiederholtem Waschen wurde der HRP/AP Polymer-Mix aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit AP Red Solution/HRP Green Solution und einer Gegenfärbung mit Nuclear Blue Solution. Mounting Medium wurde aufgetragen, die Schnitte wurden mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.3 MOLEKULARBIOLOGIE

3.3.1 DNA EXTRAKTION

Die DNA-Extraktion aus Zelllinien erfolgte mittels Wizard Genomic DNA Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde das Zellpellet zunächst lysiert und von Proteinen und RNA befreit. Mit Isopropanol und Ethanol wurde die DNA daraufhin aufgereinigt.

Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit dem NanoDrop Spectrometer ND-1000 bestimmt. Die Absorption der DNA Probe wurde photometrisch bei 260 nm gemessen. Die Konzentration wurde in ng/µl angegeben.

3.3.2 QUANTITATIVE REAL TIME PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Wiederholung mehrerer DNA Replikationszyklen *in vitro*. Durch die Nutzung spezifischer Primer wird so ein bestimmter DNA Bereich amplifiziert. Ein PCR Zyklus besteht aus der Auftrennung des Strangs durch Hitze (Denaturierung), der Bindung der gegenläufigen Primer an den Strang (Annealing) und der Bildung des neuen Strangs (Elongation). Durch die Wiederholung der Schritte kommt es zur exponentiellen Vermehrung des gewünschten Abschnitts (siehe Abb. 6).

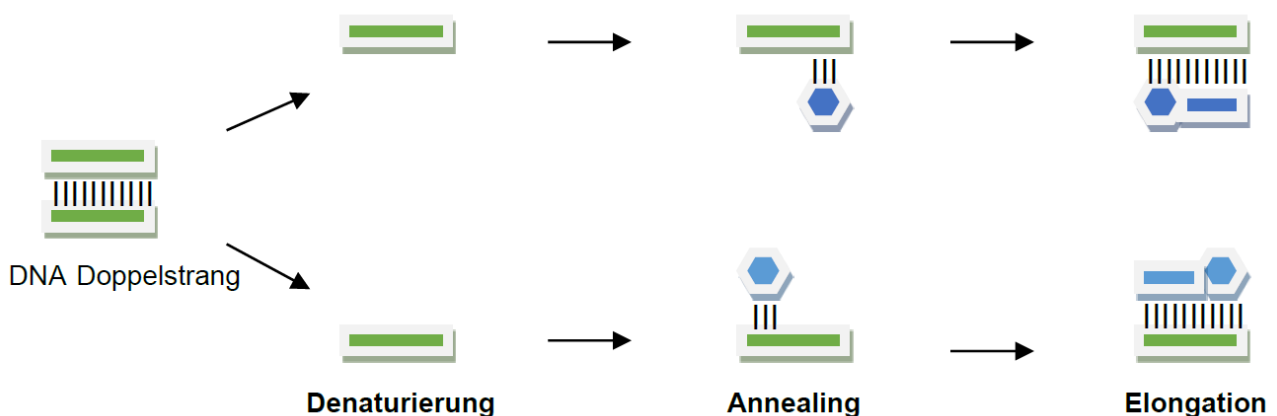


ABBILDUNG 6: DREI TEILSCHRITTE EINES REAKTIONSZYKLUS DER PCR

Die quantitative real time PCR basiert auf dem Prinzip der PCR und der Darstellung durch einen Fluoreszenzfarbstoff. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I lagert sich an doppelsträngige

DNA an. So nimmt die Fluoreszenzstärke proportional mit der Menge des amplifizierten Gens zu. Die Fluoreszenz wurde bei 530 nm detektiert (Abb. 7).

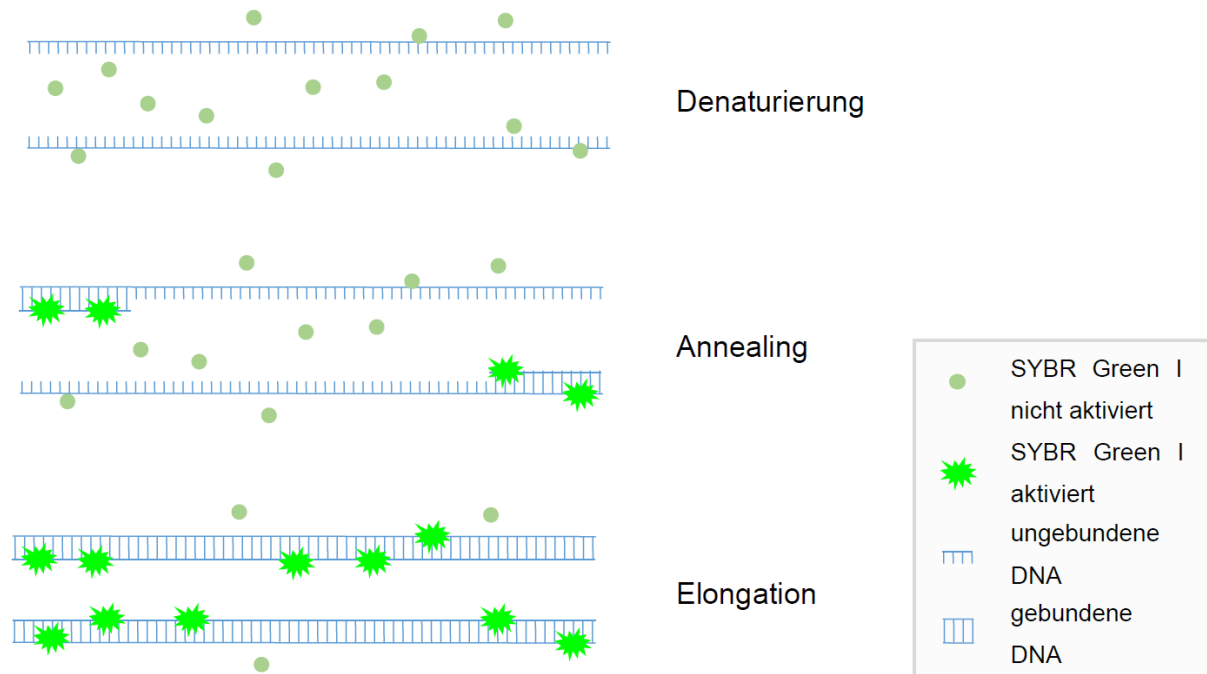


ABBILDUNG 7: PRINZIP DER REAL-TIME PCR MIT SYBR GREEN I
EIGENE ABBILDUNG IN ANLEHNUNG AN SYBR GREEN DYE ASSAY, THERMO FISHER SCIENTIFIC (278)

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem SensiFastSYBR Hi-Rox-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mit kommerzieller humaner genomischer DNA. Das repetitive Element LINE1 diente als endogene Kontrolle. Als Matrizie wurden 30 ng gDNA pro Reaktion eingesetzt und wie in Tabelle 13 dargestellt amplifiziert.

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95 °C	2/3 min
40	95 °C	5 s
40	60-65 °C	10 s
40	72 °C	5-20 s
	4 °C	∞

TABELLE 13: QPCR ZYKLUS MIT SYBR GREEN I

Die Auswertung erfolgte mit dem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Algorithmus. Die Anzahl der PCR Zyklen bis zu dem Schwellenwert, an dem die Fluoreszenz die Hintergrundstrahlung überschreitet, wird als Ct-Wert gekennzeichnet. Dies wird für das EGFR-Gen und die endogene Kontrolle LINE1 durchgeführt, die Differenz der Ct-Werte ΔCt wird ermittelt. Dieser ΔCt -Wert wird zum ΔCt -Wert des Kallibrators in Relation gesetzt. Aus diesen Differenzen wurde ein relativer quantitativer Wert (RQ-Wert) berechnet mit der Formel:

$$\text{RQ} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$$

FORMEL 1: RQ-WERT BERECHNUNG

PCR Produkte besitzen eine spezifische Schmelztemperatur, bei der die DNA wieder denaturiert. Da unspezifische Produkte, wie beispielsweise Primerdimere, bei niedrigeren Temperaturen schmelzen, können sie von spezifischen PCR Produkten in einer Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden. Dadurch wird verifiziert, dass das Ergebnis nicht durch Nebenprodukte verfälscht wird.

Die qPCR wurde mit dem StepOne V2.1 im StepOne Plus Cyclyer angefertigt, initial wurde die Schmelzkurvenanalyse (Abb. 8) durchgeführt. Alle Ansätze wurden in technischen Triplikaten gemessen, daher wurde aus den drei RQ-Werten der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt und mit Hilfe von Microsoft Excel und StepOne V2.1 dargestellt.

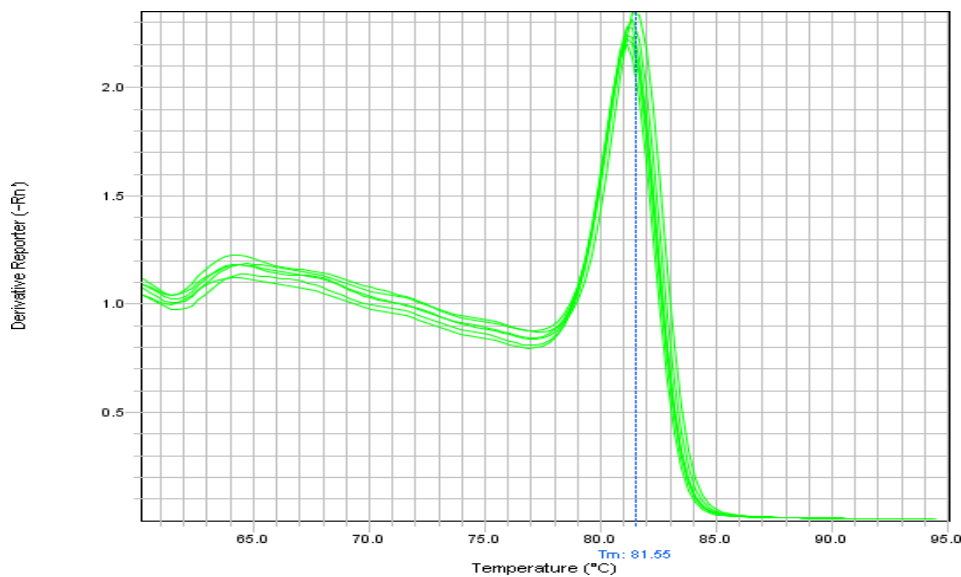


ABBILDUNG 8: SCHMELZKURVENANALYSE

3.3.3 PROTEINISOLATION

Für die Proteinisolation wurden die Zellen wie unter 3.1.1. beschrieben geerntet und durch Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) pelletiert. Die Zellpellets wurden anschließend in Lysepuffer resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung von Zelldebris wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13000 x g, 4 °C) und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte via BCA Assay nach Herstellerangaben.

3.3.4 SDS PAGE

Bei der SDS Page werden Proteine durch ein elektrisches Feld nach ihrem Gewicht aufgetrennt. Dafür wird die Probe im Verhältnis 1:1 mit Laemmli Puffer gemischt. Das darin enthaltene β -Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken. Das SDS bindet proportional zur Länge der Proteine und sorgt für eine negative Gesamtladung. Die Elektrophorese führt deshalb zu einer Trennung der Proteine nach Masse. Größenmarker mit bekannter Größe werden ebenfalls neben den Proben aufgetragen um die Größe zu vergleichen.

Das Gemisch aus Probe und Puffer wird 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend auf das Sammelgel aufgetragen. Der Gellauf startet im neutralen Sammelgel in einer Gelkammer bei 80 V. Die Spannung wurde ab Eintritt der Probe ins Trenngel auf 100 V erhöht.

3.3.5 WESTERN BLOT

Das Western Blot Verfahren ist ein Immundetektionsverfahren zur Visualisierung von Proteinen durch Antikörper auf einer Membran. Um Proteine durch spezifische Antikörper nachzuweisen, werden die Proteine auf dem Gel nach der Auftrennung durch SDS Page durch eine elektrische Spannung auf eine PVDF Membran transferiert. Danach wird das Protein mittels indirekter Immundetektion sichtbar gemacht. Die Membran wird dafür zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper und später mit einem hrp-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert.

Damit die Proteine an der PVDF Membran haften, wurde diese mit 100 % Ethanol benetzt. Danach wurde die Membran für 10 min in Anodenpuffer 2 inkubiert. Zwei Blottingpapiere wurden in Anodenpuffer 1, ein Blottingpapier in Anodenpuffer 2 und drei Blottingpapiere in Kathodenpuffer gelegt. Das SDS Gel wurde ebenfalls 10 min im Kathodenpuffer inkubiert.

Danach wurde der Blot wie folgt zusammengesetzt: auf die positiv geladene Anode kamen die Blottingpapiere aus dem Anodenpuffer 1, dann die aus dem Anodenpuffer 2, die PVDF Membran, das SDS-Gel und schlussendlich die Blottingpapiere aus dem Kathodenpuffer. Die negative Kathode, in Form des Gerätedeckels schloss die semi-dry Blotting Kammer ab. Durch semidry Transfer wurden die Proteine 45 min lang bei 40 mA in der Blotting Kammer auf die PVDF Membran übertragen. Um später unspezifische Antikörper Bindung zu verhindern, wurde die Membran über Nacht in Blockierungspuffer gelegt. Die Membran wurde mit dem Primärantikörper, der nach Herstellerangaben in 2 % Milchpulver in TBS verdünnt wurde, 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte das Waschen der Membran zweimal 5 min mit TTBS und zweimal 5 min mit TBS. Die Membran wurde dann mit dem Sekundärantikörper, der nach Herstellerangaben in 2 % Milchpulver in TBS verdünnt wurde, 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederholt wurde die Membran zweimal 5 min mit TTBS, zweimal 5 min mit TBS und 5 min mit Tris/HCl gewaschen. Die Visualisierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Super Signal West Femto KIT (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

4. ERGEBNISSE

Wie in Abschnitt 1.1.3. beschrieben, ist das GBM durch eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität gekennzeichnet. Eine häufig auftretende Aberration ist die erhöhte EGFR Amplifikationsrate. Bisherige Versuche, eine Zelllinie mit erhaltener EGFR Amplifikationsrate zu etablieren, waren weitestgehend unbefriedigend. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob geringe Mengen EGF als Zusatz in serumfreiem Medium zum Erhalt der EGFR-Amplifikation und somit zur Optimierung des Tumormodells beitragen können.

4.1 CHARAKTERISIERUNG IM VORFELD DER ARBEIT

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden PDX ausgehend von patientenindividuellen GBM Gewebeproben etabliert. Alle gewonnenen Gewebeproben wurden im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock als GBM diagnostiziert. (279)

4.1.1 VERIFIKATION DER GENETISCHEN IDENTITÄT DER PDX MODELLE

Zur Verifizierung der Zuordnung der in dieser Arbeit verwendeten PDX zu deren jeweiligen Primärtumoren wurden im Vorfeld der Arbeit genetische Fingerprint Analysen durchgeführt. Da der genetische Fingerprint nur bei eineiigen Zwillingen identisch ist, eignet er sich zur Identifikation und zur Verifizierung der korrekten Zuordnung des Xenografts zum jeweiligen Primärtumor. Die Anzahl der Wiederholungen von bestimmten Genloci, den variable number tandem repeats (VNTRs) ist individuell unterschiedlich und für jeden Menschen spezifisch. Bei der Untersuchung mehrerer solcher Loci ergab es ein für das Individuum spezifisches Profil. In Tabelle 14 sind die Profile der untersuchten Tumore bzw. PDX dargestellt. Die Ziffer benennt die Anzahl der Wiederholungen des betreffenden Genlocus. Das Vorhandensein von nur einer Ziffer bedeutet, dass das Merkmal homozygot vorliegt.

A

Tumor ID	D5S818	D7S820	D16S539	D13S317	Amelogenin
HROG22 Tumor	10, 12	8, 9	11	12, 14	m
HROG22 PDX T5	10, 12	8, 9	11	12, 14	m
HROG33 Tumor	10, 11	7, 13	8	10	f
HROG33 PDX T2	10, 11	7, 13	8	10	f
HROG59 Tumor	10, 12	9, 11	8, 10	8	m
HROG59 PDX T2	10, 12	9, 11	8, 10	8	m

B

Tumor ID	vWA	TPOX	TH01	CSF1
HROG22 Tumor	14, 15	8	6, 9	12
HROG22 PDX T5	14, 15	8	6, 9	12
HROG33 Tumor	16, 18	8, 11	6, 9	10, 11
HROG33 PDX T2	16, 18	8, 11	6, 9	10
HROG59 Tumor	16, 18	11	7, 10	10
HROG59 PDX T2	16, 18	11	7, 10	10

TABELLE 14: FINGERPRINT GENDATEN-ÜBERSICHT
DER PRIMÄRTUMOREN UND XENOGRAFTS **A** UND **B** (279)

Die Genprofile der Primärtumore stimmten in allen Fällen mit ihren korrespondierenden Xenografts überein. Der Verlust bei CSF-1 zwischen HROG33 und HROG33 PDX T2 ist zu vernachlässigen und schwächt nicht die Aussagekraft des Fingerprints.

4.1.2 MOLEKULARPATHOLOGISCHE ANALYSEN DER PDX MODELLE

Übliche GBM Merkmale, wie der Methylierungsstatus des MGMT Promotors und weitere Mutationen wurden ebenfalls in Vorarbeiten untersucht.

Nur der HROG22 Tumor und sein PDX weisen einen positiven Methylierungsstatus auf, HROG33 Tumor, HROG59 Tumor und die entsprechenden PDX sind unmethyliert. Die untersuchten Mutationen KRAS, BRAF und p53 waren weder im Tumor, noch im korrespondierenden PDX vorhanden. Die mit einer besseren Prognose korrelierenden Mutationen der IDH1 und IDH2 konnten ebenfalls in keinem der Tumore oder ihren Xenografts detektiert werden. Somit sind alle untersuchten Merkmale der GBM Tumore in den jeweiligen PDX identisch und konnten erhalten werden. (279)

4.2 ETABLIERUNG DER ZELLINIEN

Ausgehend von zwei GBM PDX, HROG33 PDX und HROG59 PDX, die eine erhöhte EGFR Amplifikationsrate aufwiesen, wurden die Zelllinien HROG33 und HROG59 etabliert. Aus dem GBM HROG22 PDX, das keine EGFR Amplifikation aufwies, wurde die Zelllinie HROG22 etabliert und als interne Kontrolle der Kulturbedingungen mitgeführt.

Für jeden PDX wurden Zellkulturen unter serumfreien Bedingungen unter Zugabe von 2 mM L-Glutamin, B27 und 10 ng/ml bFGF angelegt. Zudem wurden den serumfreien Zellkulturen verschiedene EGF Mengen zugesetzt (0 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 1,5 ng/ml, 2 ng/ml, 2,5 ng/ml, 10 ng/ml und 30 ng/ml). Als Kontrolle wurde pro PDX eine Zelllinie unter Standardbedingungen (10 % FKS, 2 mM L-Glutamin) angelegt. Die aus dem jeweiligen GBM PDX gewonnenen Zellen wurden bei der Etablierung der verschiedenen Modelle zu gleichen Teilen auf alle Kulturvarianten aufgeteilt.

4.2.1 MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIEN

Wie in 1.3.2. beschrieben, neigen Zellen in serumfreiem Medium und durch bFGF Gabe zur Neurosphärenbildung. Diese Beobachtung konnte in allen Zelllinien der drei analysierten Fälle bestätigt werden (Abb. 9-11). Die Zelllinien bildeten in serumfreiem Medium frei bewegliche Neurosphären oder semiadhärente Neurosphären mit leicht zu lösendem Oberflächenkontakt. Im Verlauf der Zellkultur wurde beobachtet, dass die Zelllinien mit zunehmender Passagierung dazu neigten, immer größere Neurosphären zu bilden. Die Morphologie der GBM Zellen konnte in serumfreiem Medium über alle Passagen hinweg gut erhalten werden. Es wurde kein Zusammenhang zwischen der EGF Konzentration und der Neigung zur Sphärenbildung oder zum Frequenzintervall der Passagierung beobachtet. In Standardmedium (10 % FKS) wuchsen die Zelllinien wie erwartet adhärent und gleichmäßig am Boden der Zellkulturflasche.

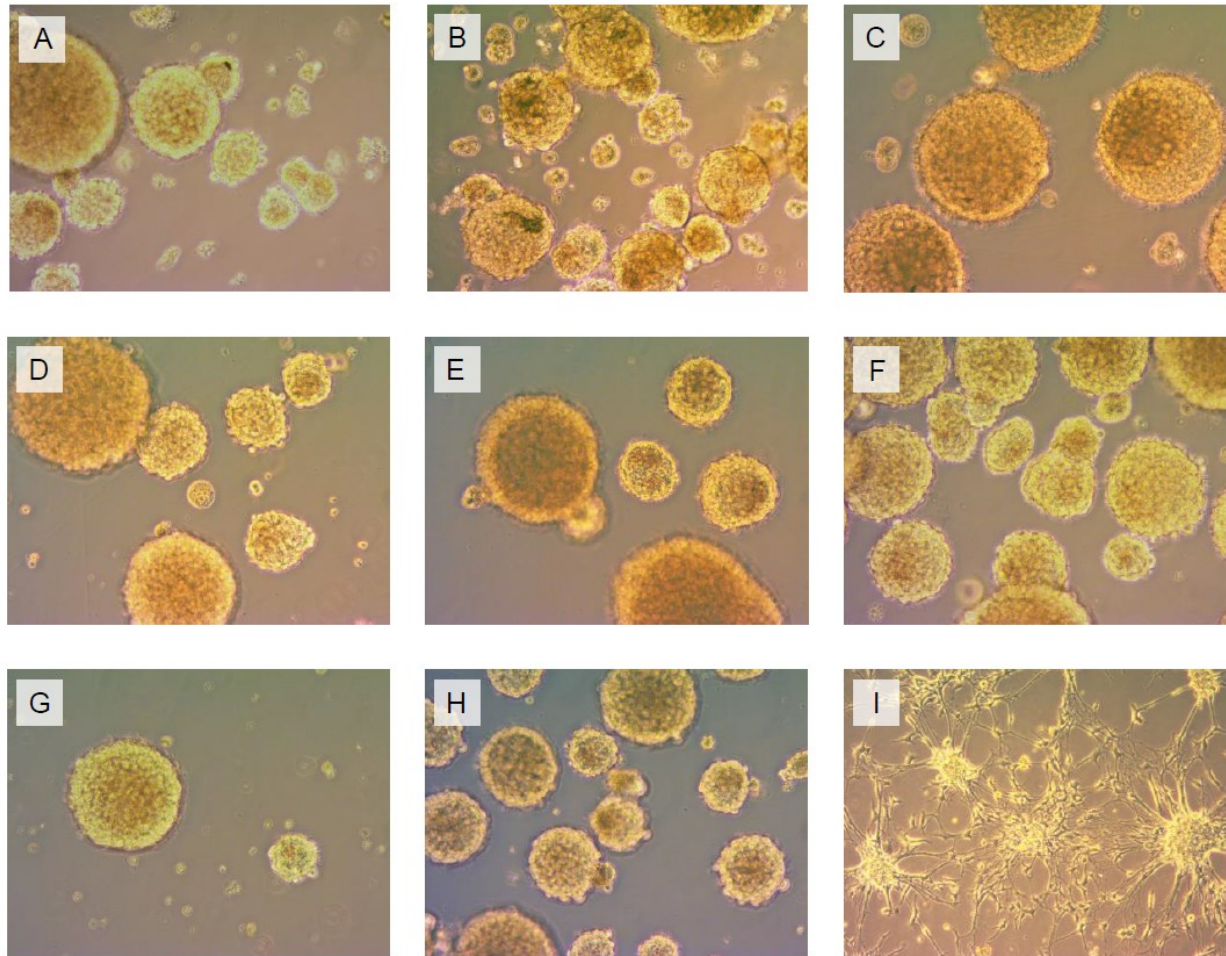


ABBILDUNG 9: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON HROG33 IN P0
 IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML BFGF UND 0 NG/ML EGF **(A)**, 0,5 NG/ML EGF **(B)**, 1 NG/ML EGF **(C)**, 1,5 NG/ML
 EGF **(D)**, 2 NG/ML EGF **(E)**, 2,5 NG/ML EGF **(F)**, 10 NG/ML EGF **(G)**, 30 NG/ML EGF **(H)** UND IN STANDARDMEDIUM 10 %
 FKS **(I)**, 200X VERGRÖßERUNG

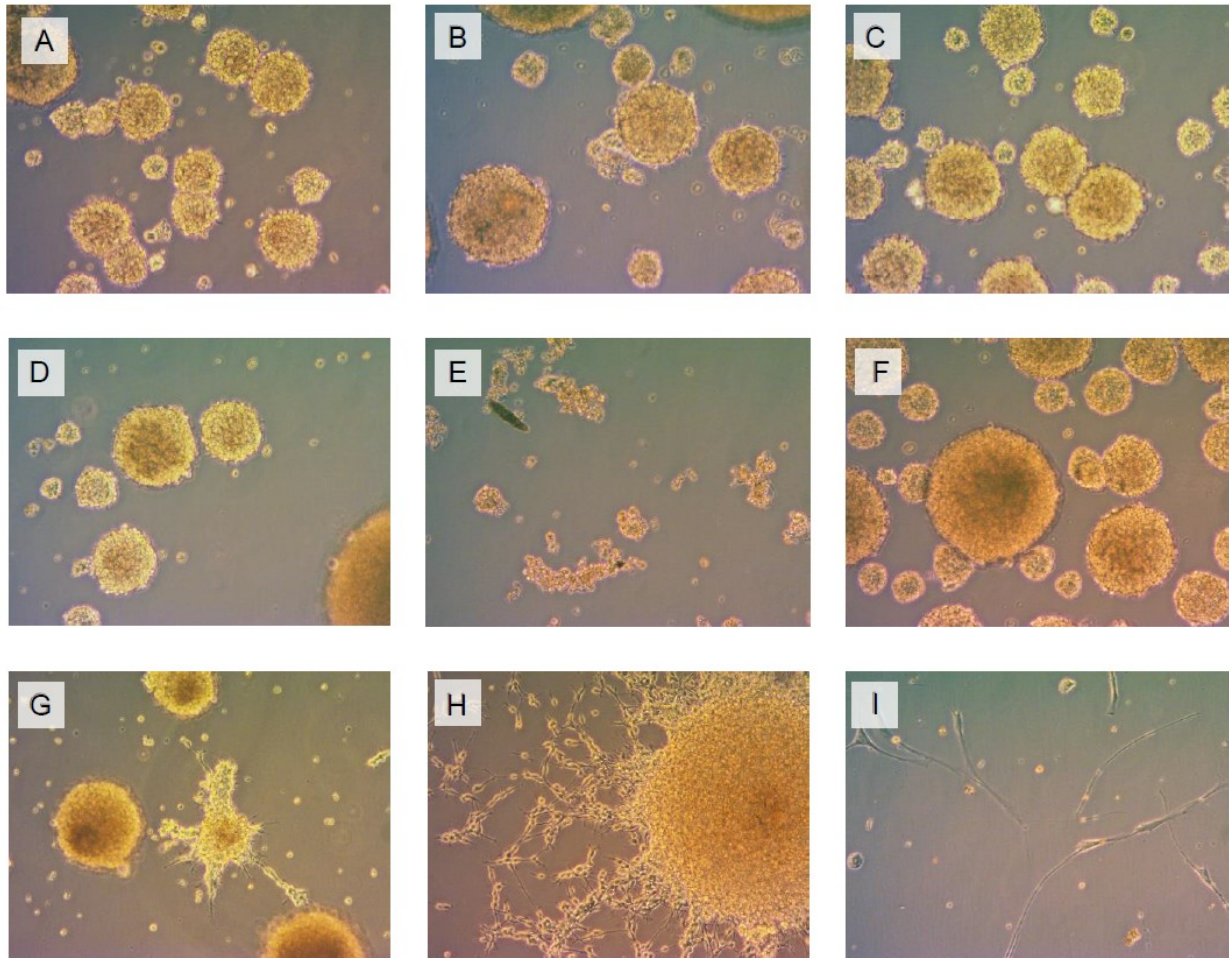


ABBILDUNG 10: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON HROG59 IN P0
 IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML BFGF UND 0 NG/ML EGF **(A)**, 0,5 NG/ML EGF **(B)**, 1 NG/ML EGF **(C)**, 1,5 NG/ML
 EGF **(D)**, 2 NG/ML EGF **(E)**, 2,5 NG/ML EGF **(F)**, 10 NG/ML EGF **(G)**, 30 NG/ML EGF **(H)** UND IN STANDARDMEDIUM 10 %
 FKS **(I)**, 200XVERGRÖßERUNG

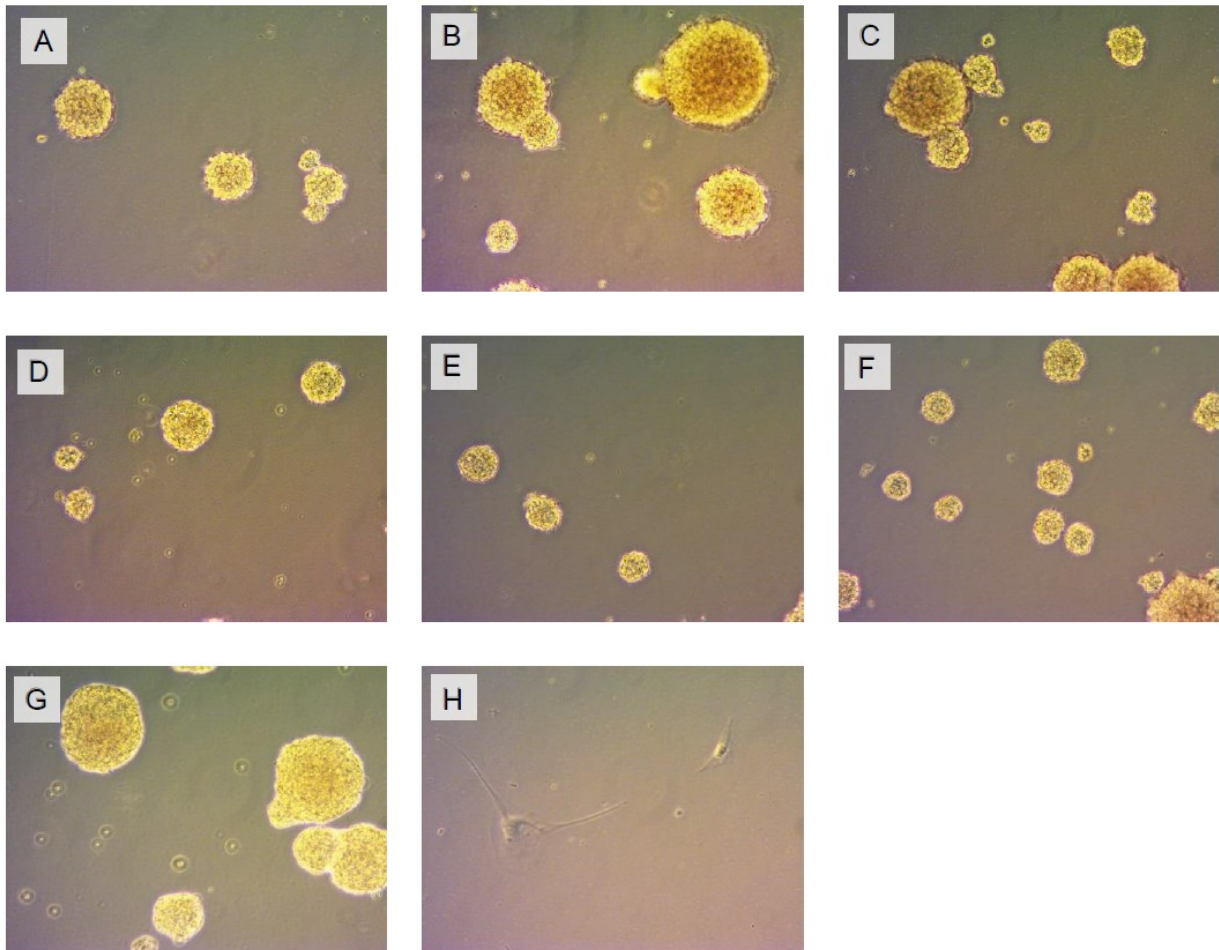


ABBILDUNG 11: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON HROG22 IN P0
IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (A), 0,5 NG/ML EGF (B), 1 NG/ML EGF (C), 1,5 NG/ML EGF (D), 2 NG/ML EGF (E), 10 NG/ML EGF (F), 30 NG/ML EGF (G) UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS (H), 200XVERGRÖßERUNG

4.3 UNTERSUCHUNG DER EGFR AMPLIFIKATION

Wie im Abschnitt 1.3.2. beschrieben, ist ein häufiges Zellkulturartefakt bei GBM der schnelle Verlust der EGFR Amplifikationsrate. Um diese in den Zelllinien und in ihren korrespondierenden Xenografts zu untersuchen, wurde die EGFR Amplifikation via qPCR und 2C CISH ermittelt und die Ergebnisse wurden miteinander verglichen.

4.3.1 BESTIMMUNG DER EGFR KOPIEZAHL

In vorherigen Arbeiten wurde die EGFR Amplifikationsrate der GBM Tumoren und ihrer PDX untersucht (Tab.15).

HROG33 zeigt im ursprünglichen Tumorgewebe eine 31-fache Erhöhung der EGFR Kopienzahl. Nach Xenograft Transplantation ist die Amplifikation weiter erhöht. Auch bei HROG59 erhöht sich die Amplifikationsrate im PDX gegenüber des Primärtumors. HROG22 zeigte weder im Primärtumor, noch im Xenograft eine EGFR Amplifikation.

Proben ID		EGFR-Amplifikation [x-fach]
HROG33	Tumor	31,00
	fT2 Xenograft	50,46
HROG59	Tumor	16,10
	fT2 Xenograft	58,36
HROG22	Tumor	0,58
	fT5 Xenograft	1,14

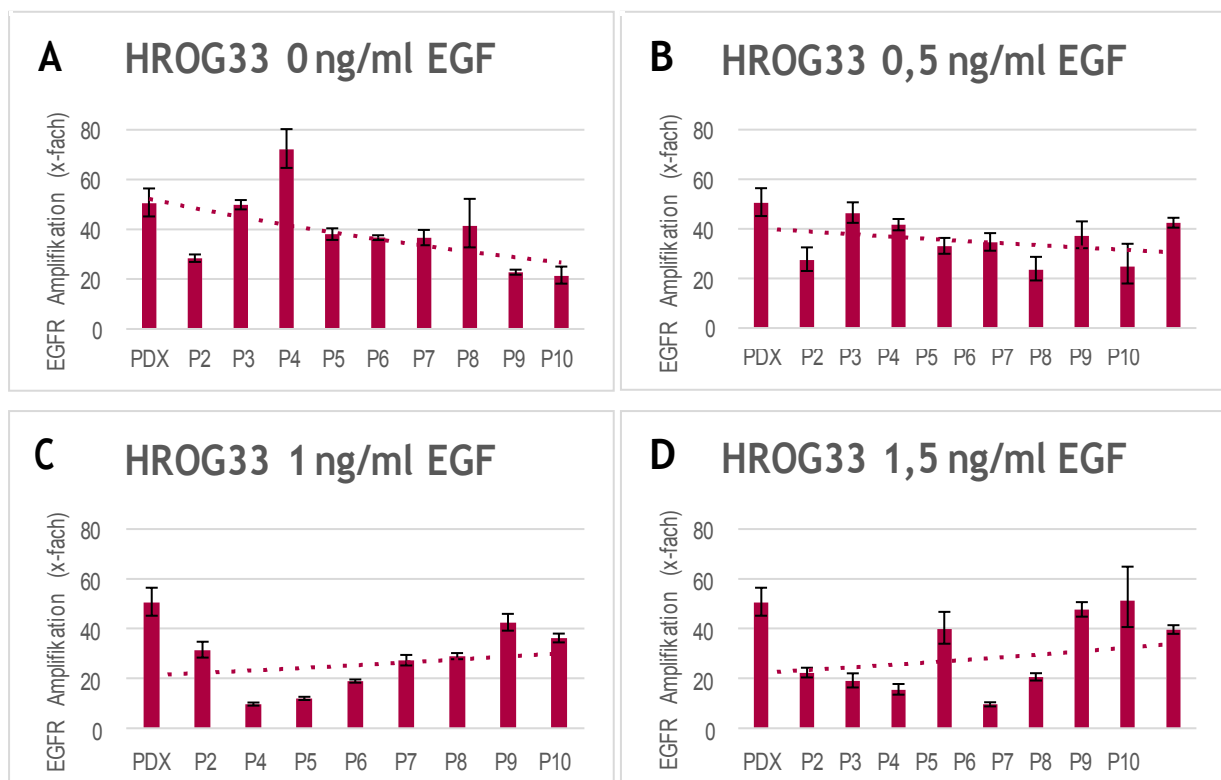
TABELLE 15: EGFR AMPLIFIKATIONS RATEN DER PRIMÄRTUMOREN (279) UND XENOGRAPTS

Das Ziel der Arbeit war es, die EGFR Amplifikation in den Zellkulturen zu allen möglichen Passagen zu betrachten. Eine Analyse der EGFR Amplifikation erfolgte in Abhängigkeit zur EGF Konzentration. EGFR gilt hierbei, wie auch in anderen Studien festgelegt, ab einer 5-fachen Erhöhung des Wertes im Vergleich zur Kontrolle (RQ=1) als amplifiziert. (136, 280) Ab einer 15-fachen Erhöhung des Wertes gilt EGFR als stark amplifiziert.

Die Ergebnisse der qPCR Analyse der Zelllinie HROG33 sind in Abbildung 12 dargestellt. Die relative EGFR Amplifikation wird in den einzelnen Balken für das ursprüngliche PDX und die untersuchten Passagen (P0-P10) für alle analysierten Konditionen abgebildet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der technischen Triplikate, die exponentielle Linie bildet den Trend ab.

Es konnte gezeigt werden, dass die EGFR Amplifikation in serumfreiem Medium ohne den EGF und mit geringen EGF Konzentrationen über mindestens 10 *in vitro* Passagen erhalten werden kann (Abb. 12 **A, B, C, D, E, F**). Jedoch erscheint die EGFR Amplifikationsrate zwischen den unterschiedlichen Passagen variabel. So zeigte sich beispielsweise in Passage 5 eine 38-fache Amplifikation, wohingegen der Wert in Passage 10 ohne Zugabe von EGF auf eine 21-fache Amplifikation sank (Abb. 12 **A**). Damit ist die EGFR Amplifikation bezogen auf den Wert des PDX (ca. 50-fache Erhöhung) auf unter die Hälfte gefallen, gilt aber dennoch als stark amplifiziert. In den Diagrammen der Abb. 12 **B, C, D** ist aber auch zu erkennen, dass geringe EGF Substitution im Medium die Amplifikation besser erhält (detaillierte Datenübersicht Tabelle A im Anhang). Die Untersuchung dieser Zellkulturen ergab EGFR Amplifikationsraten,

die sich näher am Ausgangswert des Xenografts befanden. Bei Zugabe von 2 und 2,5 ng/ml EGF (Abb. 12 **E** und **F**) waren mit einer ca. 20-fachen Erhöhung der EGFR Amplifikation in P10 ähnliche Ergebnisse wie bei EGF Entzug zu erzielen. Damit konnte die Amplifikationsrate ebenfalls erhalten werden. Bei der Zugabe von 10 ng/ml (Abb. 12 **G**) ist mit einer 7,6-fachen Erhöhung des Werts grenzwertig von einer Amplifikation zu sprechen. Sehr hohe EGF Konzentrationen wie 30 ng/ml EGF senken die EGFR Amplifikationsrate rapide ab (Abb. 12 **H**). Dieses Ergebnis ist mit der Kultivierung in Standardmedium mit 10 % FKS (Abb. 12 **I**) vergleichbar. Dadurch wird ersichtlich, dass die EGFR Amplifikationsrate in serumfreiem Medium prinzipiell mit der Zugabe von 10 ng/ml bFGF ohne und mit EGF Substitution von 0,5 bis 10 ng/ml erhalten werden kann. Sehr hohe EGF Konzentrationen tragen nicht zur Erhaltung der EGFR Amplifikation bei. Weiterhin wird deutlich, dass verschiedene EGF Konzentrationen die Kultivierung beeinflussen. Es erscheint, als ob eine Substitution von 10 ng/ml bFGF und geringe EGF Konzentrationen die EGFR Amplifikation besser erhalten, als das serumfreie Medium ohne EGF, oder mit 10 ng/ml EGF. Eine klare Tendenz ist bei den serumfreien Zellkulturen mit 0 bis 2,5 ng/ml aber nicht zu erkennen, sowohl ein leichter Anstieg wie auch Abfall werden beobachtet. Hierbei bleiben die gemessenen RQ-Werte der Zelllinien meist geringer als der RQ-Wert des PDX.



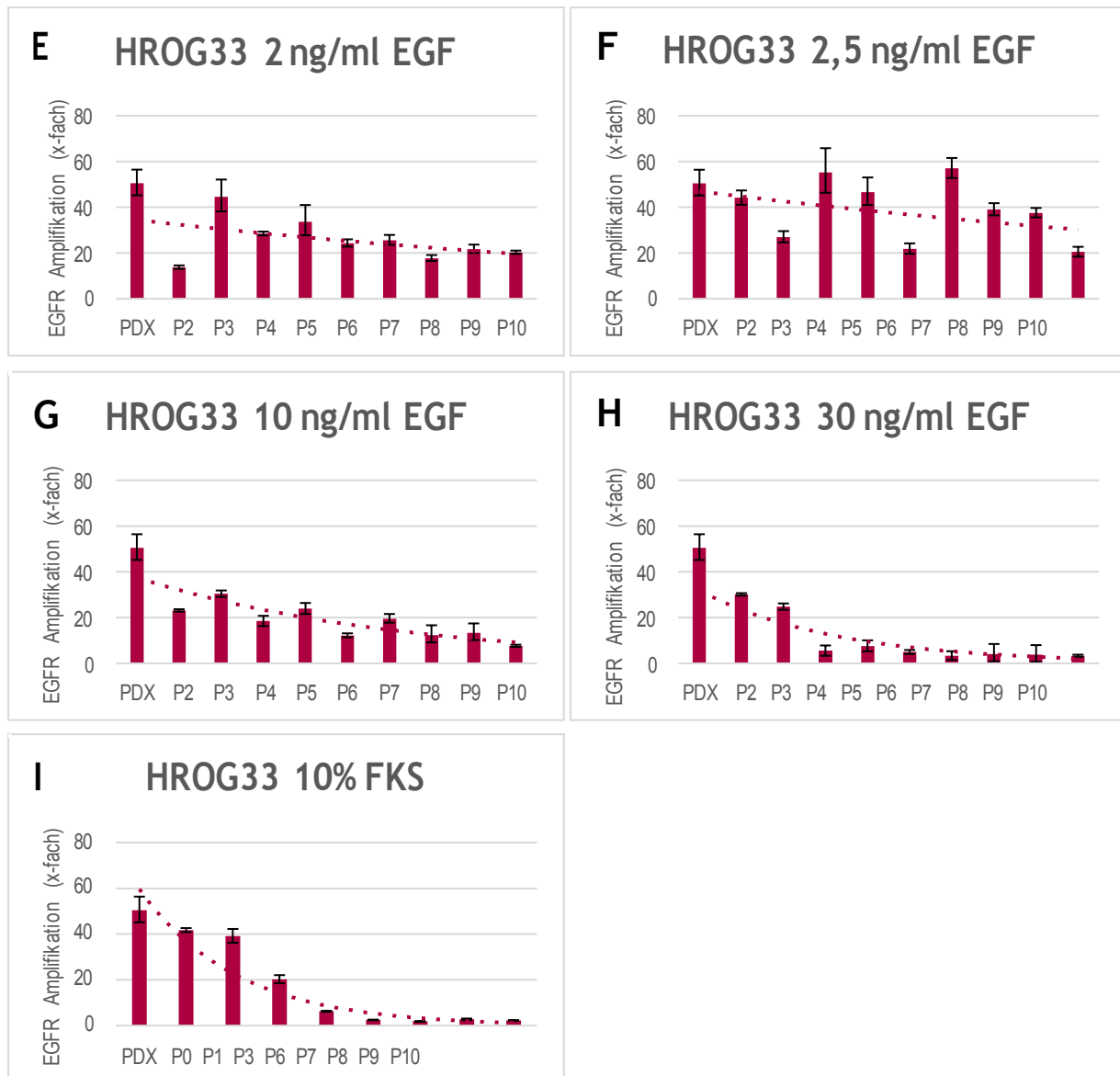


ABBILDUNG 12: qPCR ANALYSE VON HROG33

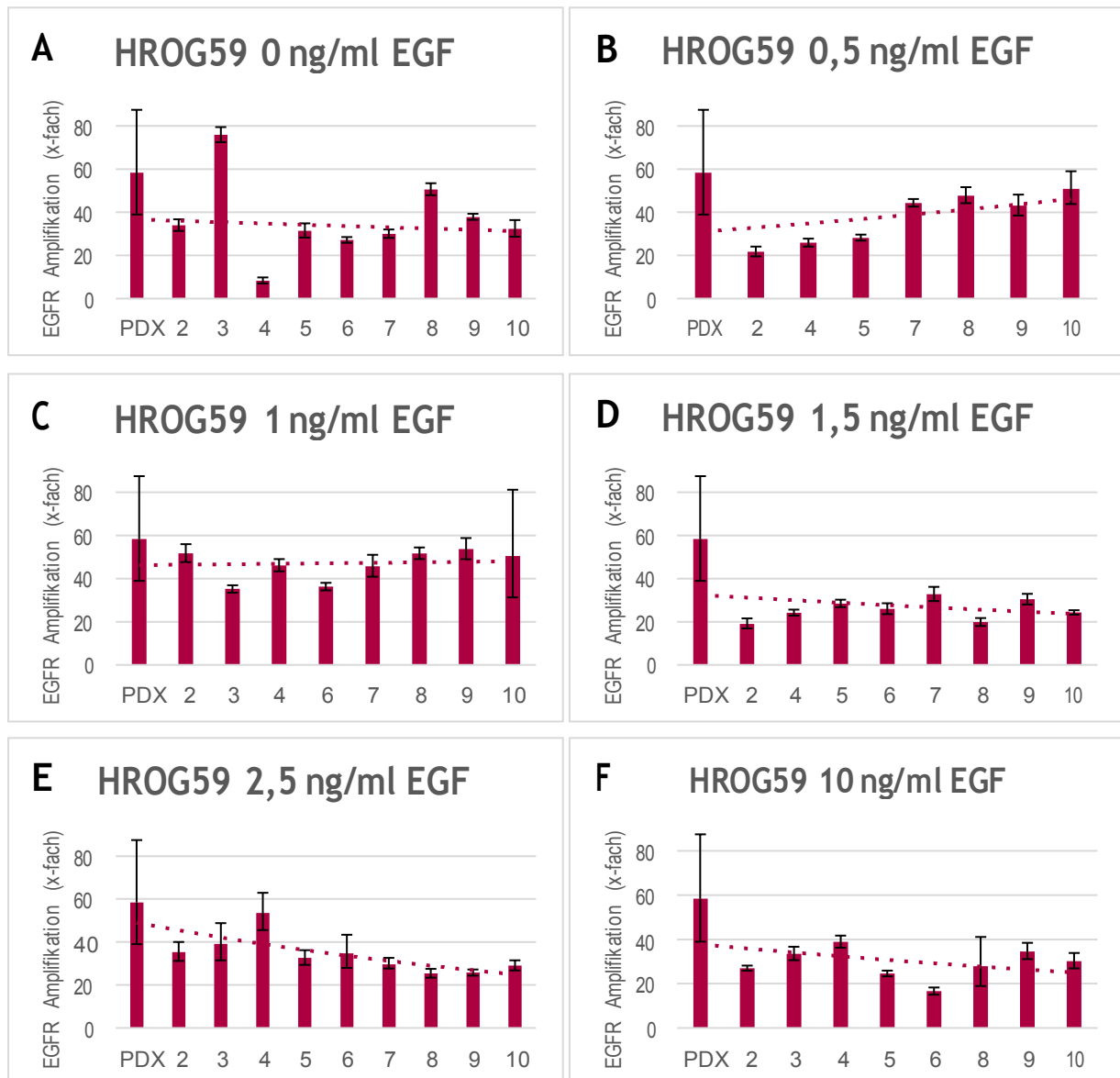
IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF **(A)**, 0,5 NG/ML EGF **(B)**, 1 NG/ML EGF **(C)**, 1,5 NG/ML EGF **(D)**, 2 NG/ML EGF **(E)**, 2,5 NG/ML EGF **(F)**, 10 NG/ML EGF **(G)** 30 NG/ML EGF **(H)** UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS **(I)**

Die Zelllinie HROG59 zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Zelllinie HROG33. Von der stark erhöhten Amplifikationsrate im Xenograft (ca. 58-fach) konnte in P10 bei 0 ng/ml EGF noch eine etwa 30-fache Erhöhung erhalten werden (Abb. 13 A).

Hier ist in P10 bei einem Zusatz von 0,5 ng/ml EGF und 1 ng/ml EGF (Abb. 13 B und C) mit einer ca. 50 fachen Erhöhung die Amplifikationsrate stärker erhöht und fast am Wert des Xenografts, von dem die Zelllinie abstammt. Bei der Zugabe von 1,5 ng/ml EGF, 2,5 ng/ml EGF und 10 ng/ml (Abb. 13 D, E, F) ist eine ähnlich erhöhte EGFR Amplifikationsrate wie bei EGF Entzug

zu erkennen. Erst bei der Zugabe sehr hoher EGF Konzentrationen (30 ng/ml EGF, Abb. 13 G) sinkt die Amplifikationsrate auf einen mit 10 % FKS vergleichbaren Wert (Abb. 13 I).

Auch hier zeigt sich ein Einfluss der verschiedenen EGF Konzentrationen auf die Kultivierung ähnlich der HROG33 Zelllinie. Geringe EGF Konzentrationen scheinen der Erhaltung der EGFR Amplifikation zuträglicher zu sein, bei sehr hoher EGF Zugabe sinkt die EGFR Amplifikation drastisch. (Datenübersicht: Tabelle B im Anhang)



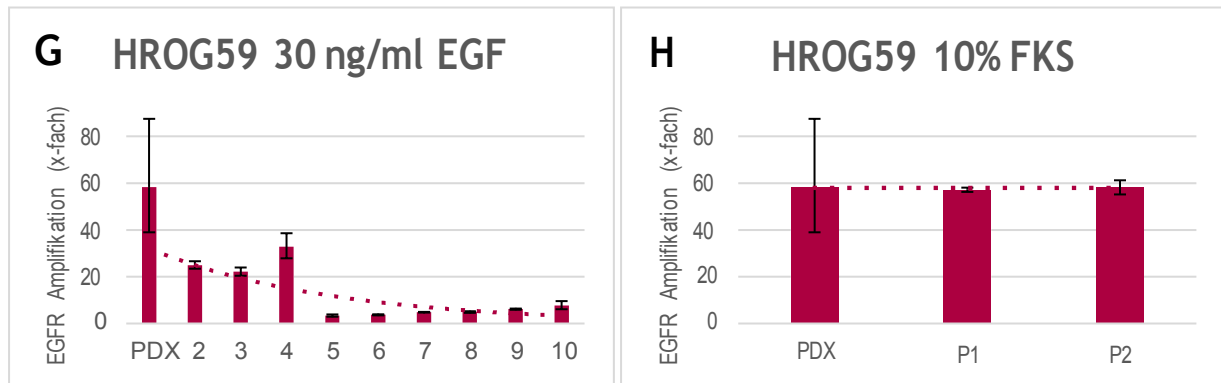
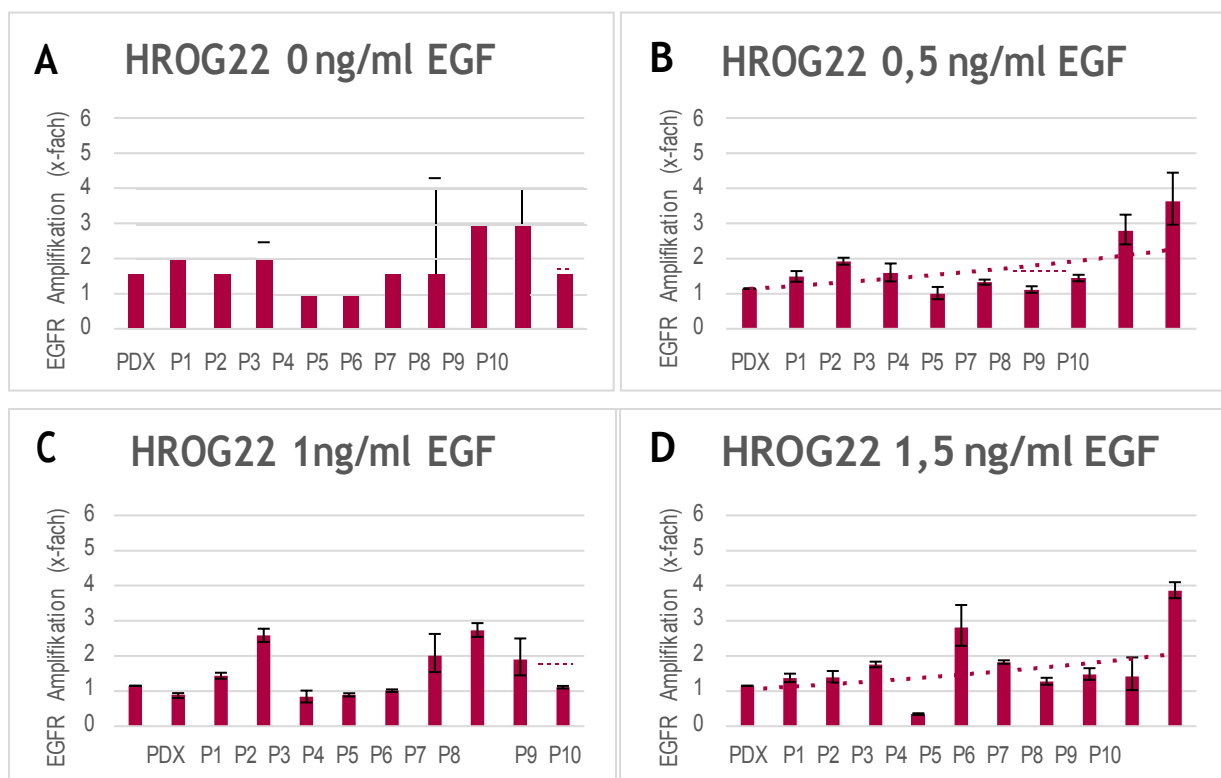


ABBILDUNG 13: qPCR ANALYSE VON HROG59
IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML BFGF UND 0 NG/ML EGF (A), 0,5 NG/ML EGF (B), 1 NG/ML EGF (C), 1,5 NG/ML EGF (D), 2,5 NG/ML EGF (E), 10 NG/ML EGF (F), 30 NG/ML EGF (G) UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS (H)

Die aus einem nicht EGFR amplifizierenden Xenograft abstammende Zelllinie HROG22 wurde als Kontrolle ebenfalls zu den genannten Konditionen kultiviert. In sämtlichen HROG22 Zellkulturen zu allen Passagen wurde HROG22 als nicht amplifiziert beurteilt (Abb. 14). Daraus folgt, dass die Zugabe von EGF in serumfreien Medium keinen Selektionsvorteil für EGFR Amplifikation beinhaltende Zellen bietet, wenn die Amplifikation in den Zellen, aus denen die Zelllinie etabliert wurde, nicht bereits erhöht ist. (Datenübersicht: Tabelle C im Anhang)



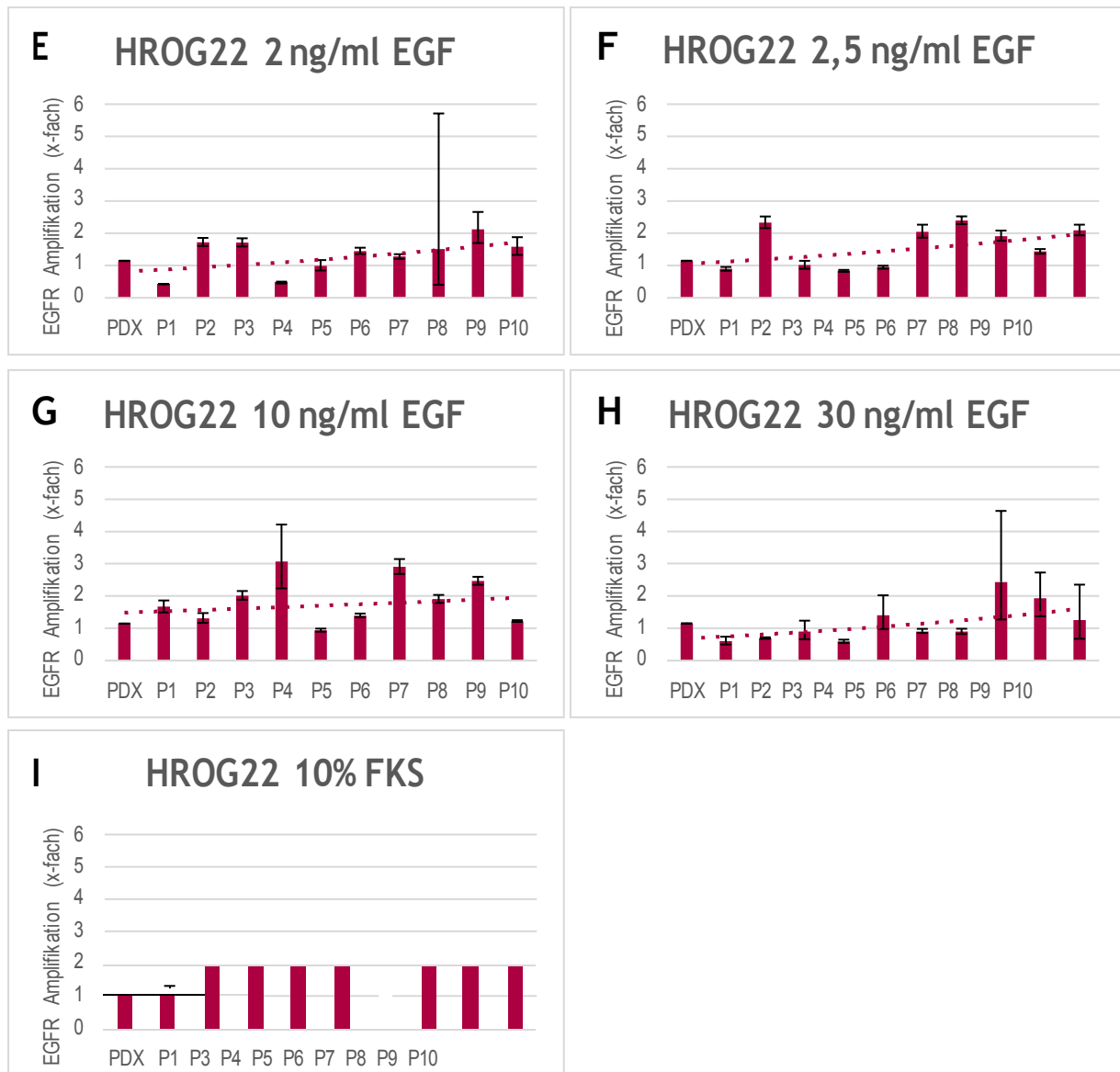


ABBILDUNG 14: qPCR ANALYSE VON HROG22

IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (A), 0,5 NG/ML EGF (B), 1 NG/ML EGF (C), 1,5 NG/ML EGF (D), 2 NG/ML EGF (E), 2,5 NG/ML EGF (F), 10 NG/ML EGF (G), 30 NG/ML EGF (H) UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS (I)

Insgesamt wird die EGFR Amplifikationsrate der Zelllinien HROG33 und HROG59 wie in Abb. 15 zu erkennen bei EGF Entzug und bei geringen EGF Konzentrationen EGF im serum-freien Medium erhalten, mit einem relativen Optimum bei Zugabe von ca. 0,5 bis ca. 1,5 ng/ml EGF. Hierbei bleiben die gemessenen Werte meist geringer als der Wert des PDX. Aber auch wenn die Ergebnisse *in vitro* geringer ausfielen als im Xenograft und variabel erscheinen, kann bei der Kultivierung im serumfreien Medium mit geringen EGF Konzentrationen ein Erfolg verbucht werden.

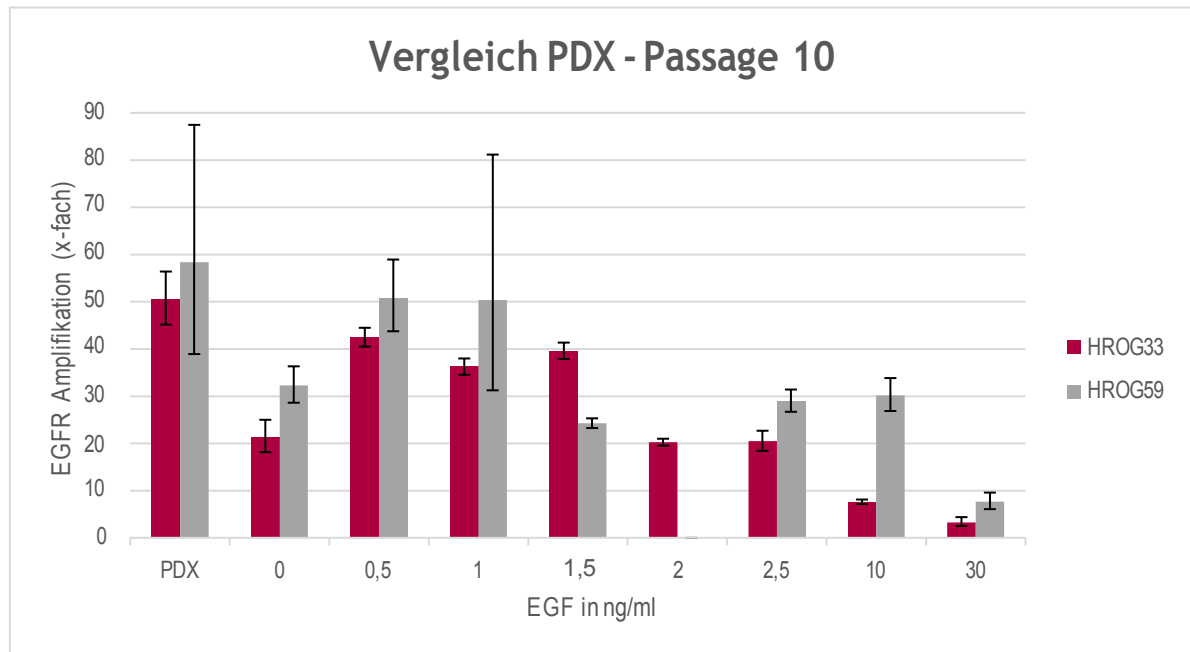


ABBILDUNG 15: VERGLEICHENDE qPCR ANALYSE VON HROG33 UND HROG59 IN P10

In Tabelle 16 wird die EGFR Amplifikation in Abhängigkeit zum ursprünglichen PDX Wert der Zellkulturen HROG33 und HROG59 in allen serumfreien Kulturkonditionen betrachtet. Dabei soll für jede Zellkultur genau erörtert werden, wie viel Prozent der ursprünglichen EGFR Amplifikationsrate im PDX bei der jeweiligen Kulturbedingung in P10 noch erhalten wurde. Die Ergebnisse werden in der sogenannten heatmap dargestellt, bei der die unterschiedlichen Erhaltungsraten in Abhängigkeit zu ihrer Höhe eingefärbt werden. Das Farbspektrum geht dabei von Dunkelgrün bei der höchsten Erhaltungsrate, über Gelb und Orange zu Rot bei der niedrigsten Erhaltungsrate. Die übrigen Werte inmitten der höchsten und niedrigsten Erhaltungsrate werden anteilig eingefärbt.

ng/ml EGF	EGFR Amplifikation (x- fach) in Abhängigkeit zum PDX-Wert	
	HROG33	HROG59
0	42 %	55 %
0,5	84 %	87 %
1	72 %	86 %
1,5	78 %	42 %
2	40 %	
2,5	41 %	50 %
10	15 %	52 %
30	7 %	13 %

TABELLE 16: HEATMAP EGFR AMPLIFIKATION IN PASSAGE 10 IN ABHÄNGIGKEIT ZUM PDX

4.3.2 WIEDERHERSTELLUNG DER EGFR AMPLIFIKATION

Wie in Abschnitt 1.3.2. angesprochen, gibt es in der Literatur unterschiedliche Aussagen darüber, ob die EGFR Amplifikationsrate stabil bleibt. Um dies zu betrachten, wurde den 30 ng/ml EGF Zelllinien, die von EGFR amplifizierenden Xenografts abstammen, nach Passage 10 das EGF entzogen. Für weitere 5 Passagen wurden die Zelllinien ohne EGF kultiviert. Diese Zelllinien werden im Folgenden HROG33 30→0 ng/ml und HROG59 30→0 ng/ml genannt.

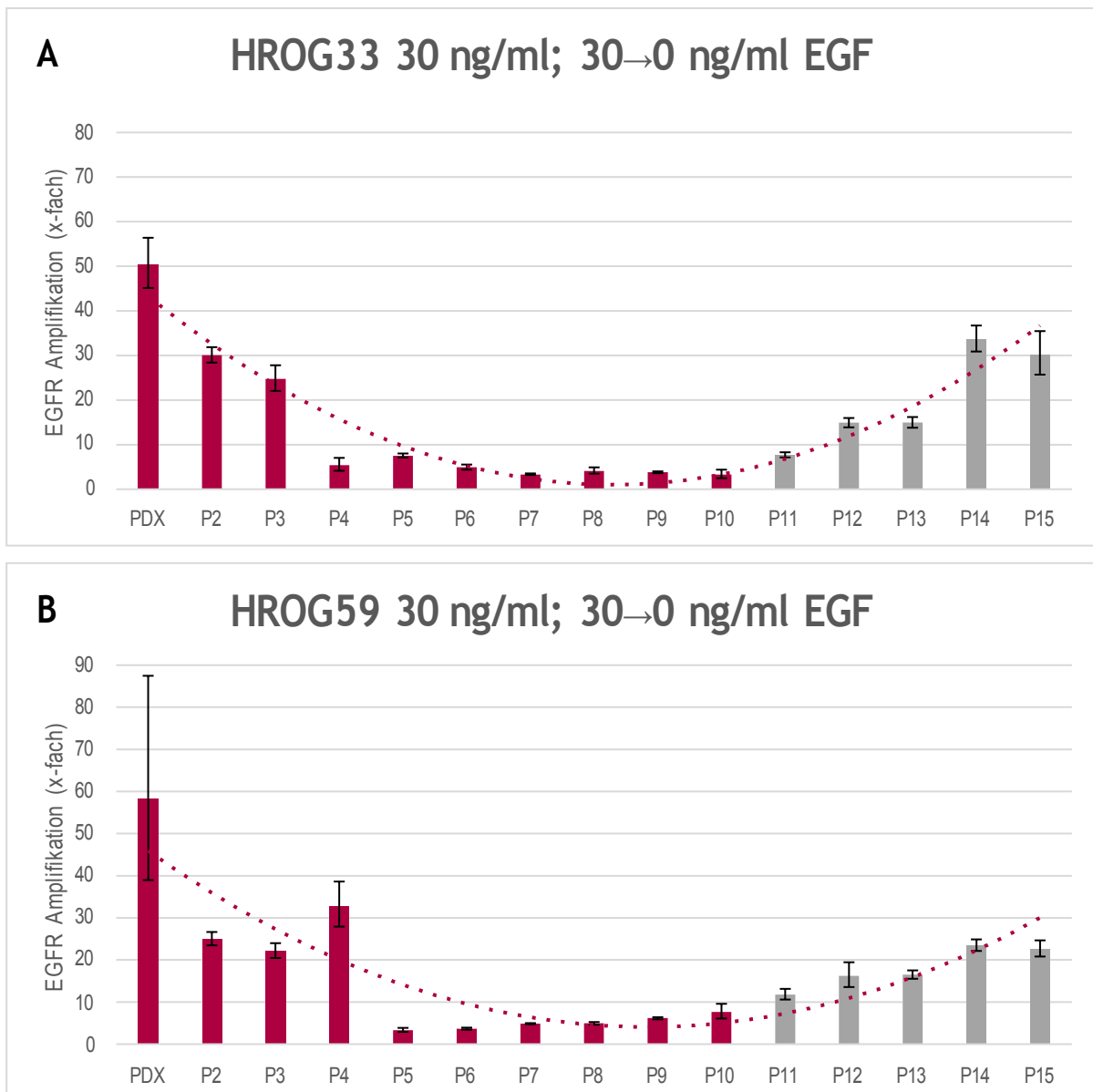


ABBILDUNG 16: qPCR ANALYSEN NACH LIGANDENENTZUG
IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 30 NG/ML EGF (**MAGENTA**) BZW. NACH EGF ENTZUG (**GRAU**) NACH KULTIVIERUNG MIT 30 NG/ML EGF VON HROG33 (**A**) UND HROG59 (**B**)

Wie in Abbildung 16 zu sehen, stiegen sowohl bei HROG33, als auch bei HROG59 nach nur 2 Passagen (P12) durch die EGF Verminderung die Werte wieder an und EGFR galt als amplifiziert. Somit ist festzustellen, dass die Amplifikationsrate in den Zelllinien nicht als stabil gewertet werden kann und durch EGF Zufuhr beziehungsweise Entzug moduliert wird.

4.3.3 ANALYSE DER EGFR GENKOPIEN *IN SITU*

Die Auswertung der Gewebeschnitte wurde in Vorarbeiten ausschließlich an den zellreichen Arealen vorgenommen, diese wurden zuvor am HE Schnitt identifiziert. Mit einem grünen Signal wurde das EGFR Gen dargestellt, mit einem roten Signal Chromosom 7 als interne Kontrolle. EGFR gilt als amplifiziert, wenn das Verhältnis des grünen zum roten Signal >2 beträgt, oder wenn das grüne Signal in Clustern erscheint. Unter diesen Bedingungen wird somit in Abbildung 17 die EGFR Amplifikation des HROG33 PDX und HROG59 PDX bestätigt. Wie erwartet ist im CISH-Gewebeschnitt des HROG22 PDX keine EGFR Amplifikation zu erkennen.

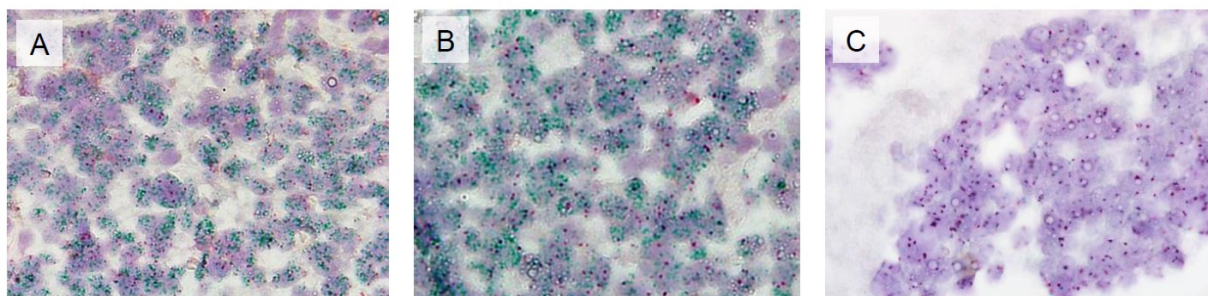


ABBILDUNG 17: 2C CISH ANALYSE DER PDX GEWEBESCHNITTE
400x VERGRÖßERUNG, HROG33 (A) HROG59 (B) HROG22 (C) (279)

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock wurden in Passage 10 der Zelllinien TMAs angefertigt. Die Auswertung wurde an den zellreichen Arealen vorgenommen, diese wurden zuvor am HE Schnitt identifiziert (siehe Abbildung A im Anhang). In den 2C CISH Analysen von HROG33 (Abb.18) sieht man deutlich ein verstärktes grünes Signal bei den serumfrei kultivierten Zellkulturen mit geringer oder ohne Ligandenzufuhr. Während in Abb. 18 G bei der Zellkultur mit 10 ng/ml EGF Zusatz wie zu erwarten ein schwächeres, aber noch als amplifiziert geltendes, Signal wahrgenommen wird, sind in Abb. 18 H (30 ng/ml EGF) und Abb. 18 I (Standardmedium, 10 % FKS) etwa gleich viele rote und grüne Signale zu erkennen und werden damit als nicht amplifiziert klassifiziert. Diese Beobachtungen sind mit den Daten der qPCR Analyse übereinstimmend.

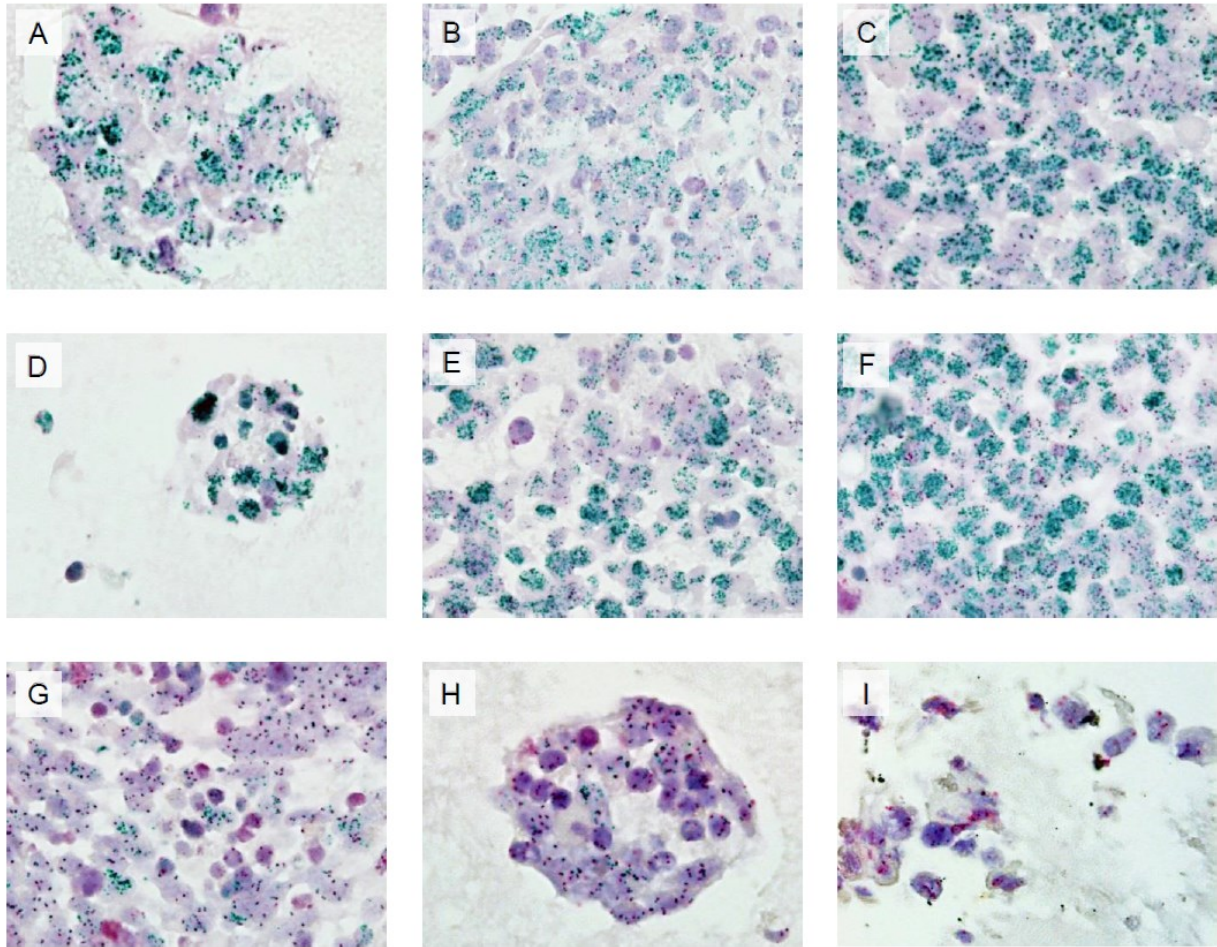


ABBILDUNG 18: 2C CISH ANALYSE DER HROG33 TMAs
IN P10 IN SERUMFREIEN MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (**A**), 0,5 NG/ML EGF (**B**), 1 NG/ML EGF (**C**),
1,5 NG/ML EGF (**D**), 2 NG/ML EGF (**E**), 2,5 NG/ML EGF (**F**), 10 NG/ML EGF (**G**), 30 NG/ML EGF (**H**), UND IN STANDARDME-
DIUM 10 % FKS (**I**), 400X VERGRÖßERUNG

Auch in den 2C CISH Analysen von HROG59 (Abb. 19) ist ein intensiv grünes Signal bei den serumfrei kultivierten Zellkulturen mit geringer oder ohne Ligandenzufuhr wahrzunehmen. Während in Abb 19 **A** wie zu erwarten ein sehr starkes Signal wahrgenommen wird, sinkt die Signalstärke mit Steigerung der EGF Zufuhr (Abb.19 **B**, **C**, **D**). Auch diese Beobachtungen decken sich mit den Daten der qPCR Analyse.

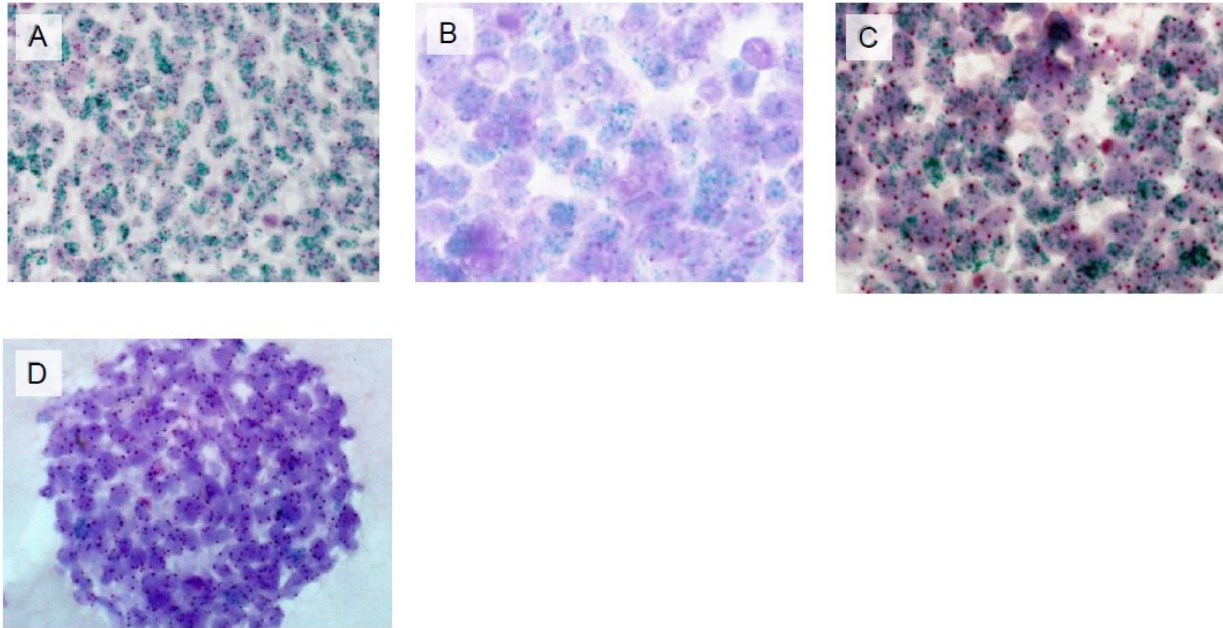


ABBILDUNG 19: 2C CISH ANALYSE DER HROG59 TMAS
IN P10 IN SERUMFREIEN MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (A), 2,5 NG/ML EGF (B) 10 NG/ML EGF (C) UND
30 NG/ML EGF (D), 400X VERGRÖßERUNG

In der 2C CISH Analyse von HROG22 (Abb. 20) ist über alle Kulturbedingungen hinweg kaum ein Signal zu beobachten und EGFR gilt als nicht amplifiziert. Auch diese Untersuchungen sind mit den Daten der qPCR Analyse übereinstimmend.

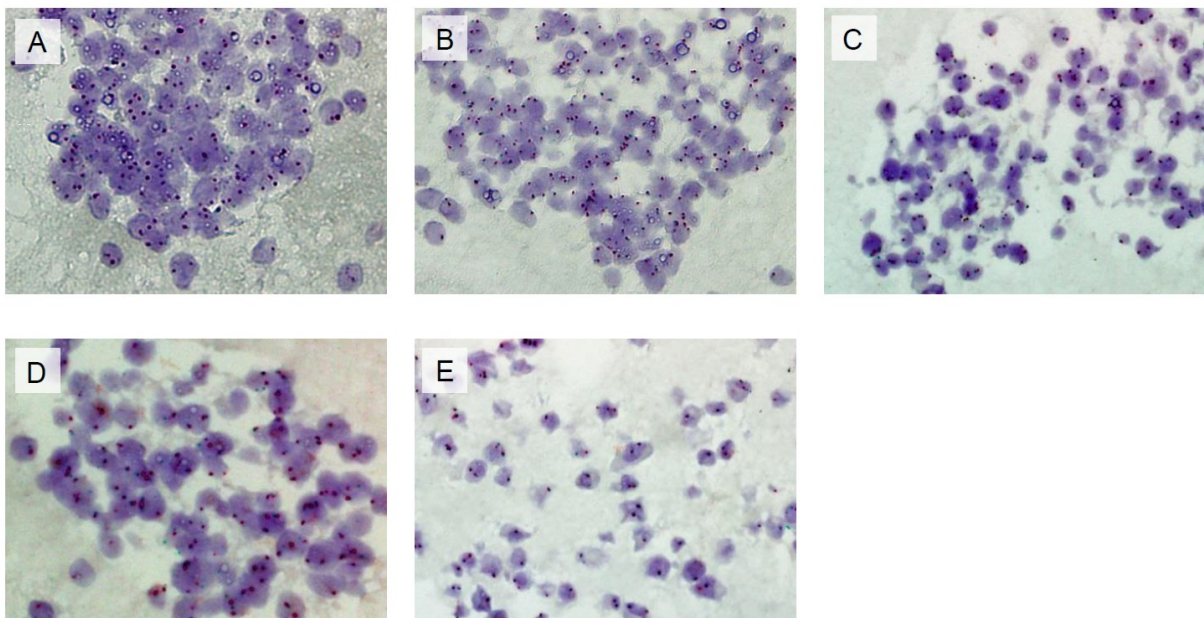


ABBILDUNG 20: 2C CISH ANALYSE DER HROG22 TMAS
IN P10 IN SERUMFREIEN MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (A), 2,5 NG/ML EGF (B), 10 NG/ML EGF (C),
30 NG/ML EGF (D) UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS (E), 400X VERGRÖßERUNG

Die Steigerung der EGFR Amplifikation der Zellkulturen, denen nach Passage 10 der Ligand EGF entzogen wurde, ist durch eine Verstärkung des grünen Signals in Passage 15 dargestellt (Abb. 21 **B** und **D**). Somit ist von einer Steigerung der EGFR Amplifikationsrate nach Ligandenentzug auszugehen. Damit korrelieren auch diese Untersuchungen mit den Ergebnissen der qPCR Analyse.

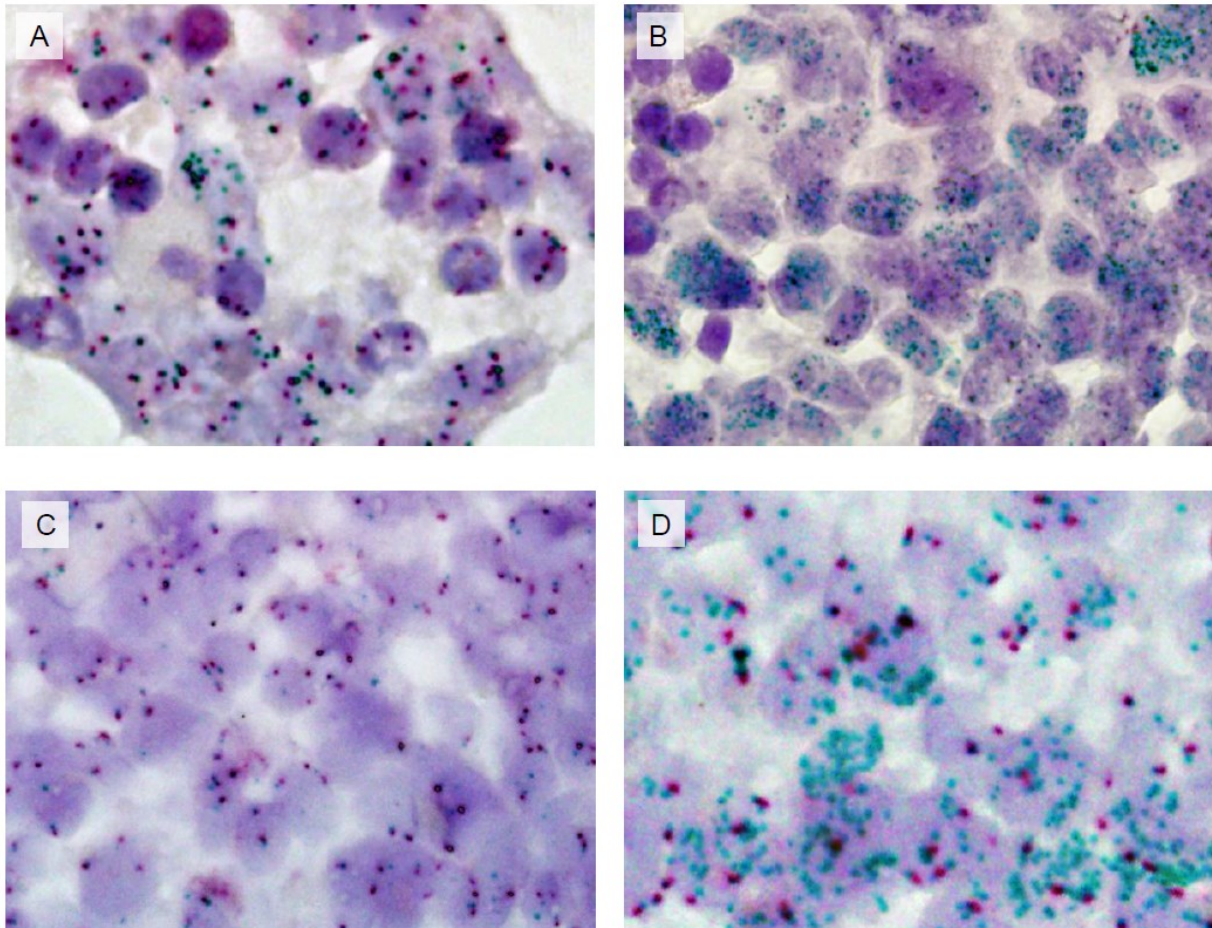


ABBILDUNG 21: 2C CISH ANALYSE DER TMAs NACH LIGANDENENTZUG
IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 30 NG/ML EGF IN P10 VON HROG33 (**A**) UND HROG59 (**C**) BZW. NACH
EGF ENTZUG NACH KULTIVIERUNG IN P15 MIT 30 NG/ML EGF VON HROG33 (**B**) UND HROG59 (**D**), 400X VERGRÖßERUNG

Auch wenn die CISH Analyse kein absolut quantitatives Ergebnis zulässt, ist dennoch ersichtlich, dass es Unterschiede in der EGFR Amplifikation zwischen den verschiedenen Zellkulturen gibt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der qPCR.

4.4 UNTERSUCHUNG DER EGFR PROTEINEXPRESSION

Da eine erhöhte EGFR Amplifikationsrate sowohl durch qPCR als auch durch 2C CISH bestätigt werden konnte, sollte im Folgenden dieses Ergebnis durch die Analyse der Proteinexpression verifiziert werden. Wie in 1.2.1. beschrieben, ist bei vorhandener EGFR Amplifikation auch häufig eine Expression anzunehmen. Um die Auswirkung der EGF Zugabe zum serumfreien Medium auch auf Proteinebene sichtbar zu machen, wurden Schnitte immunhistochemisch gefärbt und Western Blot Analysen durchgeführt.

4.4.1 ANALYSE DER EXPRESSION DURCH IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNG

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock wurden TMAs angefertigt. Die EGFR Expression wurden mittels Immunhistochemie (IHC) dargestellt.

4.4.1.1 EGFR ANALYSE DURCH IHC

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung mit einem Antikörper gegen EGFR zu sehen. Betrachtet wird HROG33 in den verschiedenen Nährmedien in Passage 10. Der vorhandene EGF-Rezeptor färbt sich braun.

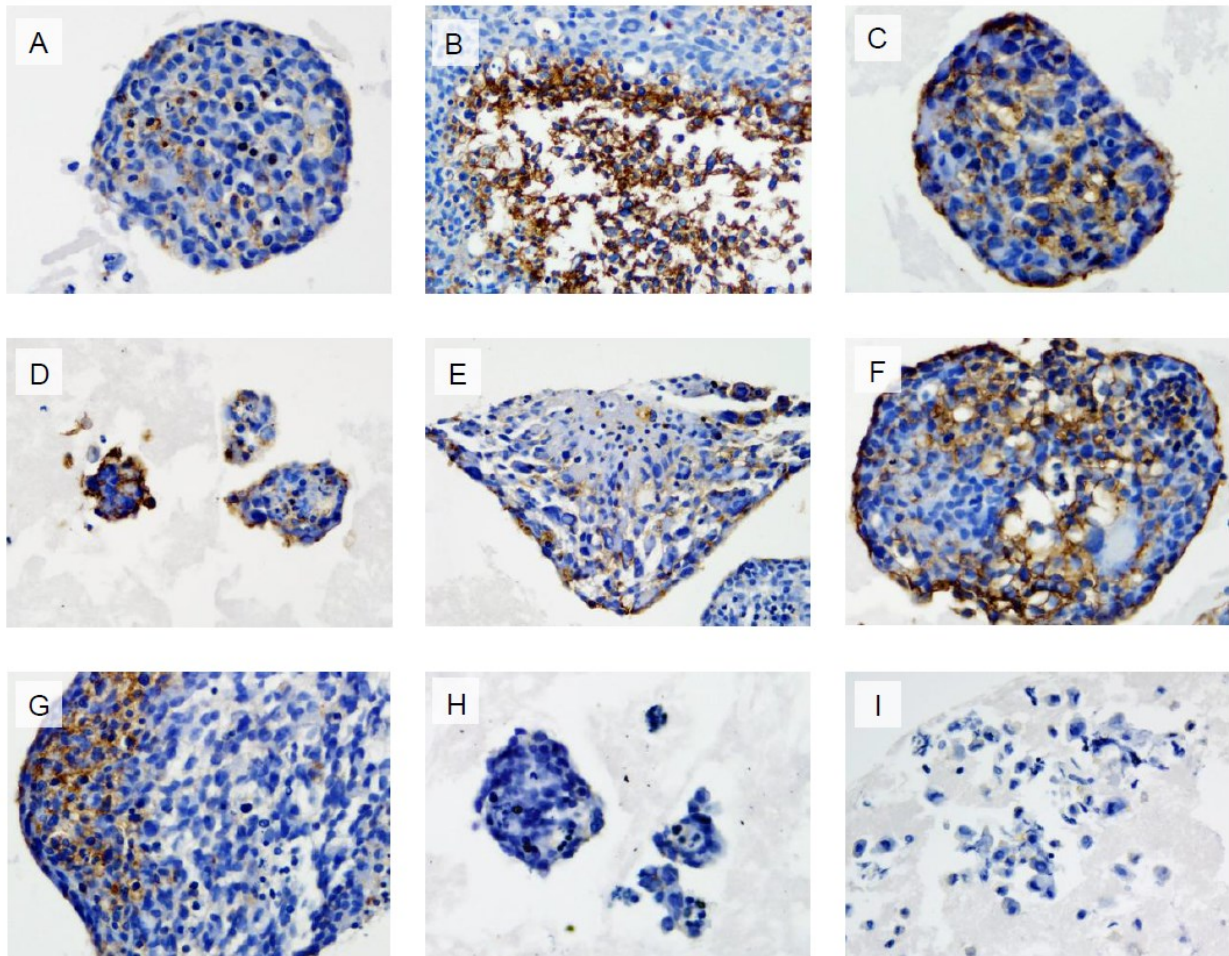


ABBILDUNG 22: HROG33 TMAs MIT IHC EGFR FÄRBUNG
MIT 400x VERGRÖßERUNG IN P10 IN SERUMFREIEN MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF **(A)**, 0,5 NG/ML EGF **(B)**,
1 NG/ML EGF **(C)**, 1,5 NG/ML EGF **(D)**, 2 NG/ML EGF **(E)**, 2,5 NG/ML EGF **(F)**, 10 NG/ML **(G)**, 30 NG/ML **(H)** UND IN STAN-
DARDMEDIUM 10 % FKS **(I)**, 400x VERGRÖßERUNG

Sowohl bei HROG33 als auch bei HROG59 ist eine Anfärbung des EGFR zu betrachten. Die mit Hämatoxylin gefärbten Zellkerne treten deutlich hervor. In den für das Nährmedium spezifisch abgebildeten Ausschnitt ist zu erkennen, dass EGFR Expression bei serumfreier Kultur mit 0-2,5 ng/ml ausgeprägt vorhanden ist. Korrelierend mit den qPCR Ergebnissen der Amplifikationsrate, ist ein schwächeres EGFR Expressionssignal im serumfreien Nährmedium mit 10 ng/ml EGF und ein sehr schwaches Signal mit 30 ng/ml EGF bzw. im Standardmedium mit 10 % FKS vorzufinden (Abb. 22 und Abb. 23).

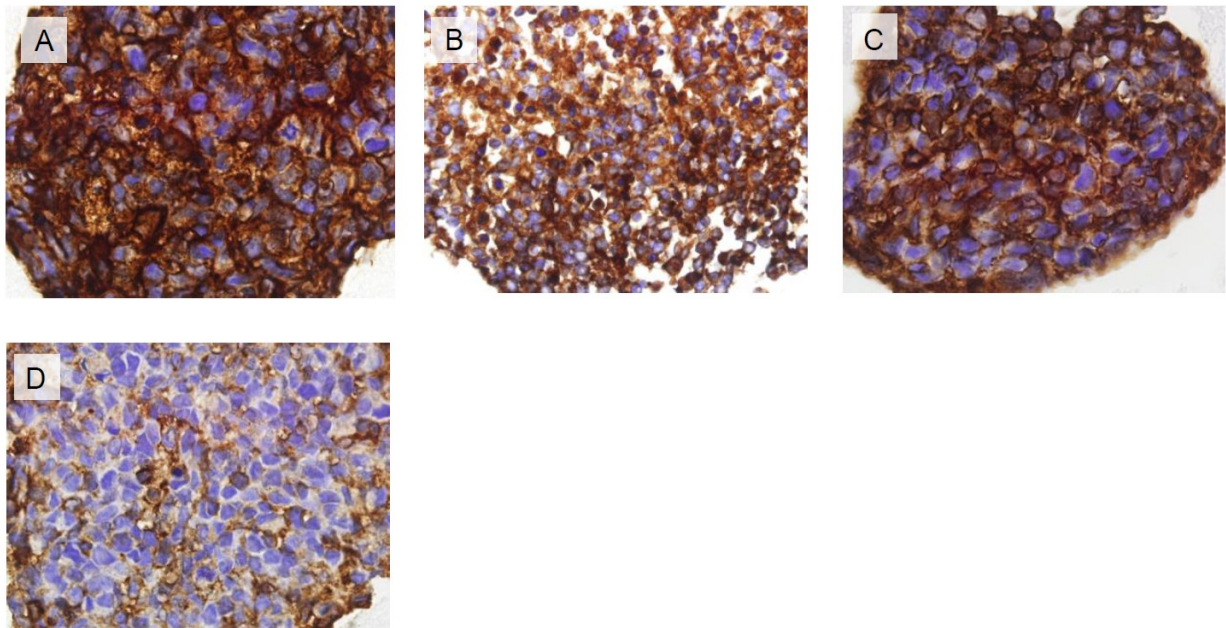


ABBILDUNG 23: HROG59 TMAs MIT IHC EGFR FÄRBUNG
MIT 400X VERGRÖßERUNG IN P10 IN SERUMFREIEN MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (A) , 2,5 NG/ML EGF (B),
10 NG/ML EGF (C) UND 30 NG/ML EGF (D), 400X VERGRÖßERUNG

Wie zu erwarten ist in HROG22 unabhängig von der Ligandenkonzentration kaum eine Anfärbung des EGFR vorzufinden (Abb.24). Dieses Ergebnis korreliert mit den qPCR Ergebnissen der EGFR Amplifikationsrate.

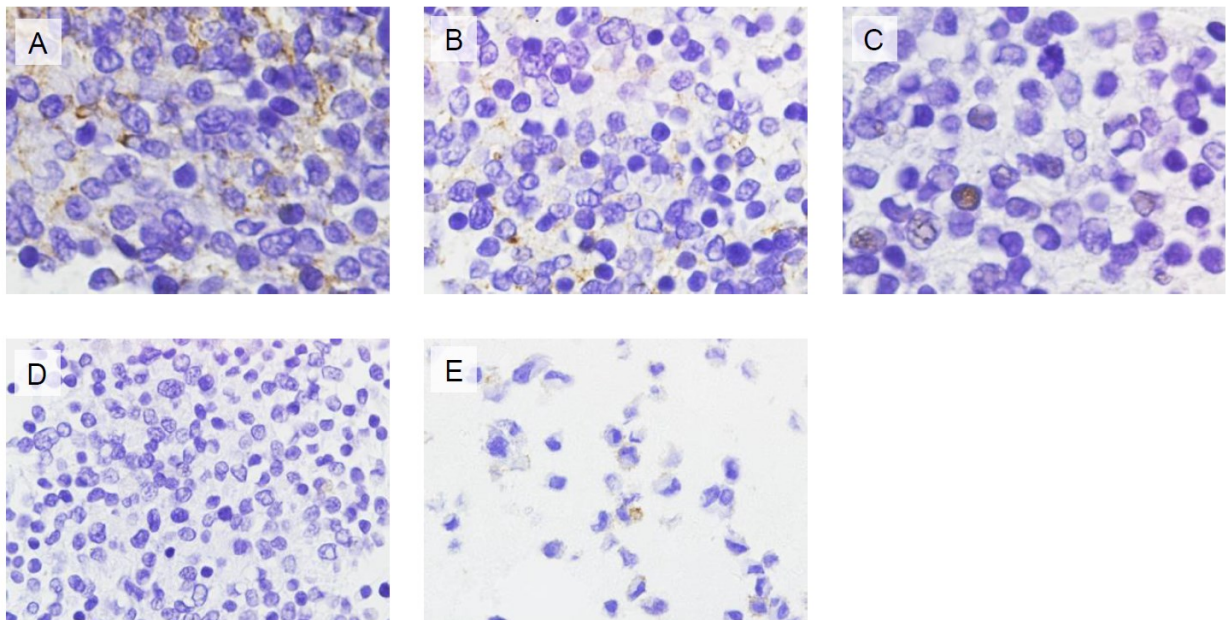


ABBILDUNG 24: HROG22 TMAs MIT IHC EGFR FÄRBUNG
MIT 400X VERGRÖßERUNG IN P10 IN SERUMFREIEN MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (A), 2,5 NG/ML EGF (B),
10 NG/ML EGF (C), 30 NG/ML EGF (D) UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS (E), 400X VERGRÖßERUNG

Auch bei der immunhistochemischen Betrachtung der Zellkulturen, denen nach Passage 10 EGF wieder entzogen wurde, ist eine vergleichsweise stärkere EGFR Färbung in der 5. Passage nach Ligandenentzug zu erkennen (Abb. 25). Somit ist von einer Steigerung der EGFR Expression nach Ligandenentzug auszugehen. Damit korrelieren auch diese Untersuchungen mit den Ergebnissen der qPCR und CISH Analysen.

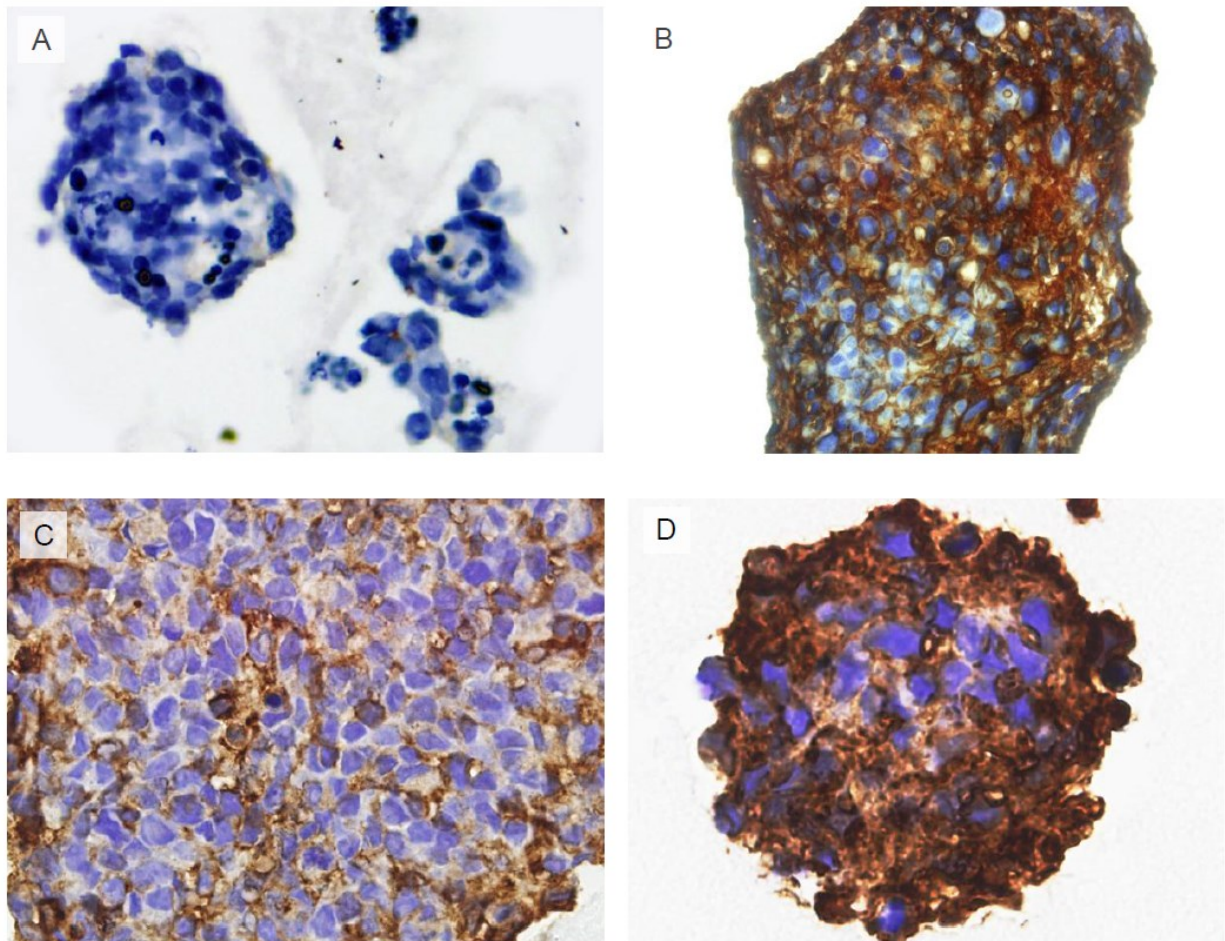


ABBILDUNG 25: TMAs MIT IHC EGFR FÄRBUNG NACH LIGANDENENTZUG
HROG33 IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 30 NG/ML EGF IN P10 VON HROG33 (A) UND HROG59 (C)
BZW. NACH EGF ENTZUG NACH KULTIVIERUNG MIT 30 NG/ML EGF IN P15 VON HROG33 (B) UND HROG59 (D), 400x VER-
GRÖßERUNG

4.4.1.2 EGFRvIII ANALYSE DURCH IHC

Im Vorfeld der Arbeit wurden die PDX via qPCR auf eine etwaige EGFRvIII Expression untersucht und im Fall von HROG33 PDX festgestellt. Daher wurden nur die TMAs von Passage 10 des HROG33 immunhistochemisch auf Vorhandensein des EGFRvIII untersucht. In

Abbildung 26 werden die Ergebnisse der IHC Anfärbung mit einem Antikörper gegen EGFRvIII des HROG33 in den verschiedenen Nährmedien gezeigt. Die EGFRvIII Expression ist, wie auch die Wildtyp Variante, bei serumfreier Kultur mit 0-2,5 ng/ml EGF (Abb. 26 **A, B, C, D, E, F**) ausgeprägt vorhanden und bei serumfreier Kultur mit 10 ng/ml EGF (Abb 26. **G**) viel weniger dargestellt. Bei 30 ng/ml EGF bzw. mit 10 % FKS ist kaum ein Signal vorzufinden (Abb 26. **H, I**). Die Ergebnisse korrelieren erwartungsgemäß mit den Färbeergebnissen des EGFR.

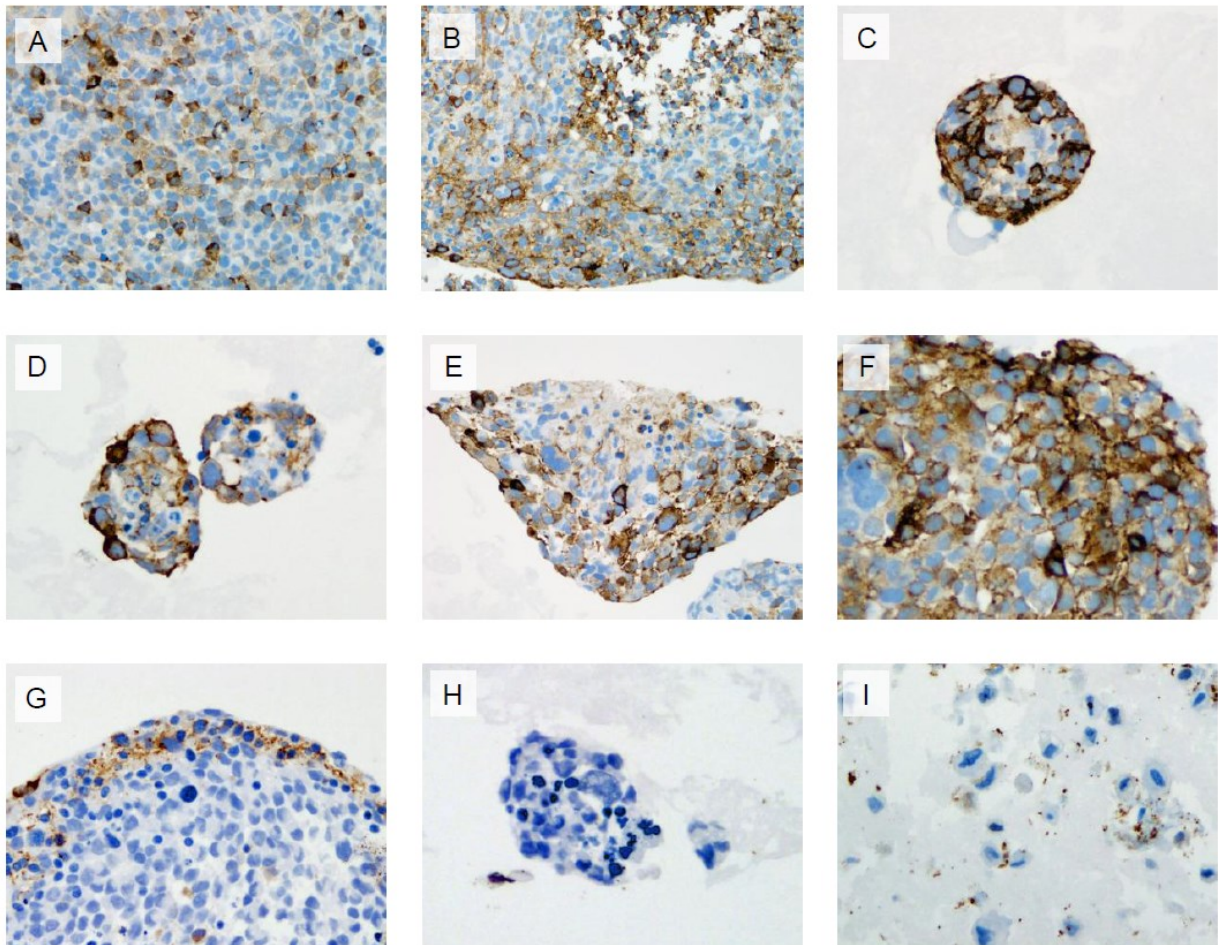


ABBILDUNG 26: HROG33 TMA's MIT IHC EGFRvIII FÄRBUNG
MIT 400x VERGRÖßERUNG IN P10 IN SERUMFREIEN MEDIUM MIT 10 NG/ML BFGF UND 0 NG/ML EGF (**A**), 0,5 NG/ML EGF (**B**), 1 NG/ML EGF (**C**), 1,5 NG/ML EGF (**D**), 2 NG/ML EGF (**E**), 2,5 NG/ML EGF (**F**), 10 NG/ML (**G**), 30 NG/ML (**H**) UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS (**I**)

Auch wenn die immunhistochemische Färbung insgesamt kein absolut quantitatives Ergebnis zulässt, ist auch hier ersichtlich, dass es Unterschiede im Expressionsprofil zwischen den verschiedenen Zellkulturen gibt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der qPCR.

4.4.2 WESTERN BLOT

Auch durch Western Blots wurde die EGFR Expression analysiert. Als Beladungskontrolle fungierte das in jeder Körperzelle exprimierte housekeeping Gen β -Actin, das sich auf Höhe von 42 kDa mit einer Bande darstellen lässt. Die Größenzuordnung der sichtbaren Banden erfolgte durch den Vergleich mit einem Protein Größenstandard. Da dieser nur auf der PVDF Membran sichtbar ist, erfolgte die Größenzuordnung durch Vergleich der Membran mit dem Röntgenfilm. Die EGFR Bande war auf Höhe von 170 kDa zu erwarten.

Der in Abb. 27 dargestellte Western Blot zeigt die sichtbargemachten EGFR-Proteine in HROG33 unter den angegebenen Kulturbedingungen. Die EGFR Expression konnte für 0,5 ng/ml, 1,5 ng/ml, 2 ng/ml, 2,5 ng/ml und 10 ng/ml bestätigt werden. Die Bande bei 0 ng/ml und 1 ng/ml war etwas schwächer detektierbar, wobei dennoch eine Expression festzustellen ist. Besonders stark wird die Bande bei 0,5 ng/ml EGF Zugabe zum serumfreien Medium dargestellt. Wie durch die qPCR Daten vermutet, ist die Bande bei 10 ng/ml schwächer dargestellt und bei 30 ng/ml bzw. Standardmedium mit 10 % FKS nicht vorhanden.

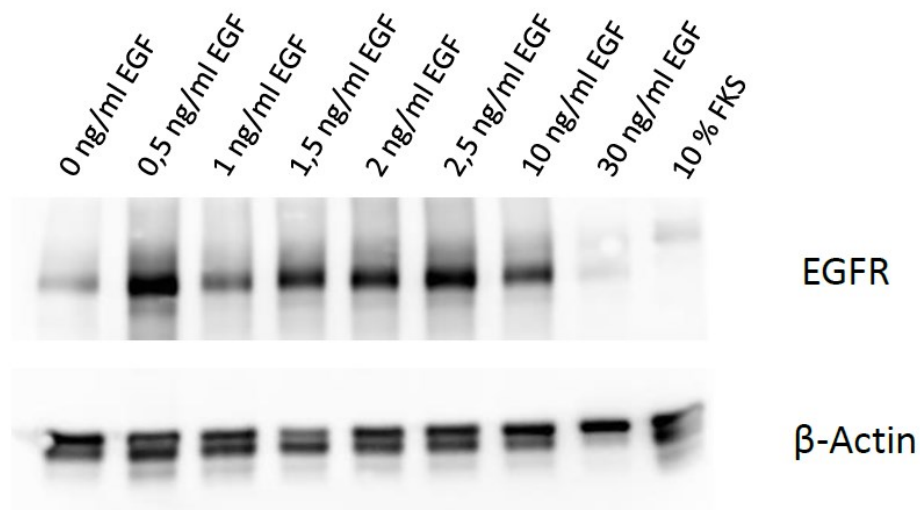


ABBILDUNG 27: HROG33 WESTERN BLOT ANALYSE DER EGFR EXPRESSION

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich wird, konnten in der Western Blot Analyse des HROG59 EGFR Banden entsprechend der qPCR Daten detektiert werden. Es zeigt sich somit, dass die EGFR Expression mit EGFR Amplifikation einhergeht. Bei 0 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 1,5 ng/ml, 2 ng/ml und 10 ng/ml EGF in serumfreien Medium ist ein starkes Signal zu erkennen. Die fehlende Bande bei 2,5 ng/ml ist vermutlich durch fehlerhafte Beladung zustande gekommen,

da auch die Ladekontrolle durch β -Actin negativ ausfällt. Wie erwartet ist keine Bande bei 30 ng/ml EGF zu beobachten.

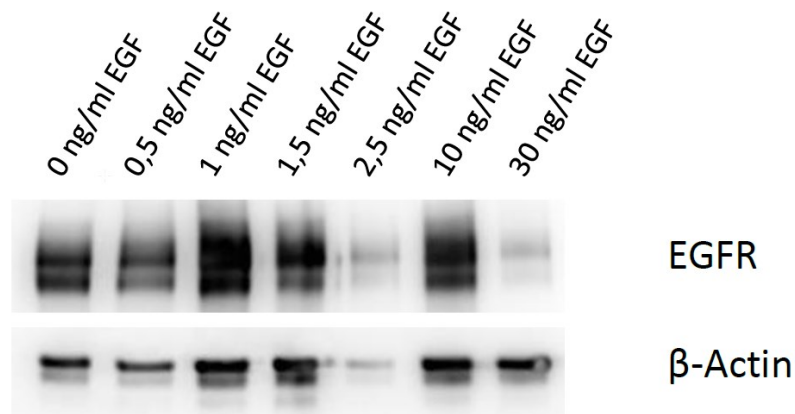


ABBILDUNG 28: HROG59 WESTERN BLOT ANALYSE DER EGFR EXPRESSION

Bei HROG22 (Abb. 29) ist bei positiver Ladekontrolle zu allen Konditionen wenig Signal detektierbar, EGFR wird sehr schwach exprimiert.

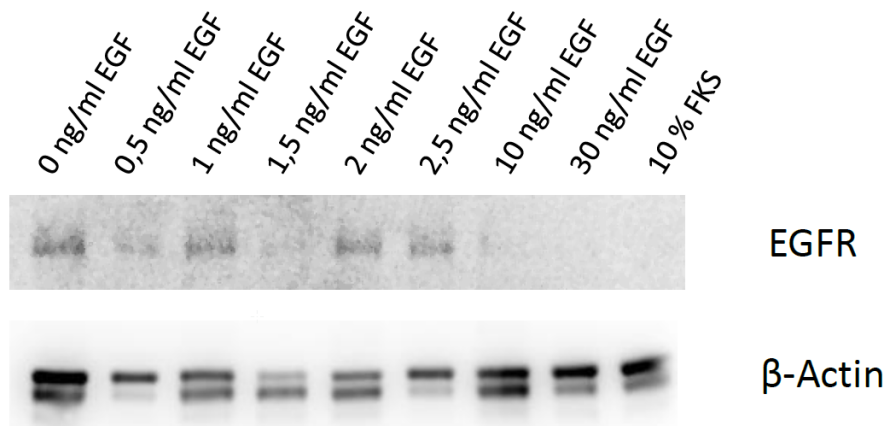


ABBILDUNG 29: HROG22 WESTERN BLOT ANALYSE DER EGFR EXPRESSION

Folglich korrelieren die Blots größtenteils mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Schnitte und den qPCR Analysen. Etwaige Abweichungen sind der hohen Sensitivität der Tests verschuldet.

5. DISKUSSION

Das GBM ist der häufigste und aggressivste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter mit einer infausten Prognose. Die genauen Ursachen der Entstehung sind bisweilen unbekannt. (1, 15) In ca. 50 % aller GBM ist eine EGFR Amplifikation vorzufinden, die mit einer erhöhten Malignität des Tumors einhergeht. (135) Um das direkte Verhalten und die Abhängigkeit der Tumorzellen in Bezug auf den EGFR zu studieren, ist die Etablierung eines adäquaten *in vitro* Tumormodells notwendig. Zentrale Herausforderung hierbei ist die Erhaltung von tumorspezifischen geno- und phänotypischen Merkmalen. Ein grundsätzliches *in vitro*-Artefakt ist jedoch der schnelle Verlust der EGFR Genamplifikation. (168, 240, 256, 257) Verschiedene Gründe wurden hierfür erörtert, von hoher EGF Konzentration in serumfreier Kultur (240), über Kultivierung mit 10 % FKS, bis zu einem willkürlich auftretenden Verlust (257). Letztgenannter Grund ist allerdings aufgrund der Regelmäßigkeit des Verlustes *in vitro* unwahrscheinlich. (168, 240, 241, 256, 264)

Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation von Zellkulturbedingungen, die die Erhaltung der EGFR Amplifikation von GBM-Zellen ermöglichen. Stockhausen *et al.* konnten mit serumfreier Kultur und dem Zusatz von EGF die EGFR Amplifikation ein Stück weit erhalten. Von 36 Patienten haben sie 18 Xenografts etabliert, sechs von diesen wurden dann mit N2, B27, 10 ng/ml bFGF und 10 ng/ml EGF in Zellkultur genommen. Von diesen sechs Zellkulturen besaßen vier im Patienten und im Xenograft eine erhöhte EGFR Amplifikation, zwei von diesen auch die EGFRvIII Mutation. Bei einem Xenograft mit besonders erhöhter EGFR Amplifikation konnten sie unter diesen Kulturbedingungen über mehrere Passagen *in vitro* EGFR und vIII Amplifikation erhalten, auch wenn die Rate im Vergleich zum Xenograft geringer war. (241) Schulte *et al.* hingegen waren erfolgreich mit EGF Entzug. Sie etablierten Zellkulturen aus Primärtumor in serumfreiem Medium mit B27, bFGF und 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml oder 0 ng/ml EGF. Zwei Zelllinien konnte die Amplifikation mit 0 ng/ml EGF in serumfreiem Medium über 20 Passagen behalten, auch wenn die relative Amplifikationsrate bei einer auf unter ein Viertel des ursprünglichen Wertes des Primärtumors gefallen war. Da somit die ersten positiven Ergebnisse im serumfreien Medium mit 10 ng/ml EGF (241) und ohne EGF (264) erzielt wurden, lag die Vermutung nahe, dass die EGF Zugabe in serumfreier Kultur die EGFR Amplifikation *in vitro* beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurden ausgehend von GBM PDX mit erhöhter EGFR Amplifikation (HROG33 und HROG59) und ohne erhöhter EGFR Amplifikation (HROG22) Zelllinien etabliert. Für jedes PDX wurden Zellkulturen unter serumfreien Bedingungen unter Zugabe von 2 mM L-Glutamin, B27 und 10 ng/ml bFGF angelegt. Serumfrei kultivierte Zellen ähneln geno- und phänotypisch stärker dem Primärtumor. (245, 248–250) Daher lag auch die Vermutung nahe, dass charakteristische Tumormerkmale wie EGFR Amplifikation wahrscheinlicher erhalten werden. (241) Der Zusatz von bFGF wurde zur Unterstützung der Zellproliferation

in allen serumfrei kultivierten Konditionen auf konstantem Niveau gehalten. Da allen Zelllinien die gleiche Menge bFGF zugeführt wurde, wirkte sich der in einer Studie beschriebene EGFR amplifikationssteigernde Effekt von bFGF auf alle gleichermaßen aus und war nicht für die unterschiedlichen Amplifikationsraten ausschlaggebend. (247) Zudem wurden den serumfreien Zellkulturen verschiedene EGF Mengen zugesetzt (0 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 1,5 ng/ml, 2 ng/ml, 2,5 ng/ml, 10 ng/ml oder 30 ng/ml). Als Kontrolle wurde für jeden PDX eine Zelllinie unter Standardbedingungen (10 % FKS, 2mM L-Glutamin) angelegt. Die Etablierung der verschiedenen *in vitro* Modelle war im Fall von HROG22 und HROG33 für alle gewählten Konditionen erfolgreich. Eine Zelllinie von HROG59 konnte unter serumfreien Bedingungen unter Zugabe von 2 ng/ml EGF nicht etabliert werden. Auch die Kontrollzelllinie mit 10 % FKS wurde im Fall von HROG59 nicht erfolgreich etabliert, die Zellproliferation stoppte nach wenigen Passagen. Für alle weiteren Konditionen konnten im Fall von HROG59 erfolgreich Zelllinien etabliert werden. Es wird angenommen, dass EGF unterschiedliche Effekte auf die Proliferationsgeschwindigkeit von Zellen mit EGFR Amplifikation hat: Während in der Modell-Zelllinie des epidermoiden Karzinoms A431 ein inhibitorischer Einfluss von EGF beobachtet wurde (281, 282), wurde in GBM Zelllinien höhere Proliferationsraten ermittelt (264). Im Rahmen dieser Dissertation war es aufgrund fehlenden Zellmaterials technisch nicht möglich die Proliferationskinetik im Detail zu betrachten, bei der Kultivierung konnten allerdings keine Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinien unter Zugabe verschiedener EGF Konzentrationen beobachtet werden.

Beim Versuch die EGFR Amplifikation im *in vitro* Modell zu erhalten, wurden diese in niedrigen Passagen analysiert, um Kulturartefakte zu vermeiden. Die Morphologie der GBM Zellen (Neurosphären im serumfreien Medium, adhärent am Boden der Kulturflasche im Standardmedium mit 10 % FKS) wurde über alle analysierten Passagen hinweg gut erhalten. Die EGF Konzentration hatte dabei keinen Einfluss auf die Neigung zur Sphärenbildung. Alle Passagen, bei denen Material zur Untersuchung entnommen werden konnte, wurden via qPCR, CISH, IHC und Western Blot auf ihre EGFR Amplifikation und Expression untersucht.

Die EGFR Amplifikation wird im serumfreien Medium mit Zusatz von EGF in geringen Konzentrationen erhalten.

Die verschiedenen EGFR Amplifikationsraten der beiden Zelllinien mit erhaltener EGFR Amplifikation, HROG33 und HROG59, wurden in Abhängigkeit zur EGF-Konzentration im serumfreien Medium analysiert. Hierbei konnte die Studie von Schulte *et al.* (264), die zeigte, dass die EGFR Amplifikation in serumfreien Medium ohne den Zusatz von EGF erhalten wird, via qPCR bestätigt werden. CISH Analysen verifizierten diesen Befund. Kontroverse Ergebnisse wurden

allerdings bei dem Versuch erzielt, die EGFR Amplifikation mit dem Zusatz von 10 ng/ml EGF zu erhalten. Während Stockhausen *et al.* unter diesen Kulturbedingungen eine Zelllinie mit erhaltener EGFR Amplifikation etablieren konnten, ist die Amplifikation bei Schulte *et al.* fast vollständig abhandengekommen. Bei der Betrachtung der Zelllinie HROG59 wird sowohl in der qPCR als auch in der CISH Analyse die erhaltene Amplifikation bei 10 ng/ml EGF im serum-freien Medium bestätigt. Die Zelllinie HROG33 zeigte jedoch diesbezüglich in der qPCR Analyse einen Rückgang der Amplifikationsrate, während die CISH Analyse eine schwächere, aber noch erhaltene EGFR Amplifikation vermuten ließ. Auch wenn insgesamt weniger Signal detektiert wurde, konnten dennoch Cluster identifiziert werden. Weitere Studien sollten den Einfluss von 10 ng/ml EGF auf die EGFR Amplifikation genauer beleuchten, aber die Vermutung liegt nahe, dass diese Kondition zur Erhaltung beiträgt.

Bei der qPCR Analyse der beiden GBM Zelllinien mit erhöhter EGFR Amplifikation im ursprünglichen Xenograft HROG33 und HROG59 wurde weiterhin beobachtet, dass geringere EGF Konzentrationen von 0,5 ng/ml bis 2,5 ng/ml EGF im Medium die Amplifikation ebenfalls sehr gut erhalten. Die per qPCR ermittelten Genkopiezahlen befanden sich nahe des Ursprungswertes des Xenografts, die Amplifikation blieb während der betrachteten Passagen erhalten. Die CISH Analysen der in P10 betrachteten Zelllinien validierten die qPCR Ergebnisse. Es wurde ein deutlich verstärktes EGFR-spezifisches grünes Signal beobachtet.

Eine sehr hohe Ligandenkonzentration (hier 30 ng/ml) wiederum mindert durch das Überangebot die Selektion der EGFR amplifizierenden Zellen. Die Amplifikation sank auf ähnliche Werte wie die Standardmediumkontrolle mit 10 % FKS. Dieses bereits in einigen Studien beobachtete Ereignis konnte sowohl durch qPCR, als auch durch CISH Untersuchungen bestätigt werden. (240, 241, 264, 265)

Auch wenn die EGFR Amplifikation über 10 Passagen erhalten wurde, ist eine starke Variabilität zwischen den Amplifikationsraten der einzelnen Passagen zu beobachten. Diese Erscheinung ist sowohl bei HROG33, als auch bei HROG59 zu allen Kulturkonditionen wahrzunehmen. Eine mögliche Erklärung für die starken Schwankungen wäre, dass nicht bei jeder Passagierung die gleiche Menge an Material entnommen wurde. So brauchten die Zelllinien unterschiedlich lange, um sich vom Splittingvorgang zu erholen und wieder Neurosphären zu bilden. Die Erholungs-dauer und Sphärenformation könnte sich auch auf die EGFR Amplifikationsrate auswirken. Des Weiteren kann, trotz aller Bemühungen die EGF Konzentration im Medium konstant zu halten, diese dennoch in geringem Umfang schwanken. Da aber die Amplifikation auch nach 10 Passagen nachweisbar ist, scheint diese Variabilität keinen der Erhaltung der Amplifikation schadenden Effekt zu bewirken.

Im Fall von HROG22 ist es nicht gelungen, aus einem EGFR negativen Xenograft eine Zelllinie zu etablieren, die eine EGFR Amplifikation aufweist. Wie in 1.2.1. beschrieben, ist die GBM EGFR Amplifikation hauptsächlich auf den extrachromosomalen double minutes lokalisiert. Die

Zugabe von EGF in serumfreien Medium konnte keinen Selektionsvorteil für die extrachromosomale EGFR Amplifikation beinhaltende Zellen bieten, wenn diese Amplifikation in dem PDX, aus dem die Zelllinie etabliert wurde, nicht bereits vorhanden war. Nach einer These von Stark *et al.* muss zunächst ein ungeplantes ursprüngliches Ereignis, wie beispielsweise fehlerhafte DNA Replikation oder invertierte Duplikation vorkommen, um extrachromosomale Amplifikation von Genen zu induzieren. (283) Nach dieser Betrachtungsweise ist dieses Ereignis im Fall des als nicht amplifizierend klassifizierten PDX HROG22 nicht aufgetreten. Dies lässt weiter vermuten, dass so ein beschriebenes Ereignis auch nicht EGF abhängig *in vitro* ausgelöst werden kann. Die deutlich geringe EGFR Expression, durch IHC und Western Blots ermittelt, sichert das Ergebnis der fehlenden EGFR Amplifikation.

Extrachromosomale DNA gilt als weniger stabil als chromosomale DNA und gibt ihre Erbinformation ungleich an die Tochterzellen weiter. Somit wird den Tumorzellen ermöglicht, sehr schnell sehr hohe EGFR Genkopienzahlen zu erhalten und damit die Heterogenität des Tumors weiter zu steigern. (139, 284, 285) Des Weiteren bewirkt extrachromosomale Onkogen-Amplifikation, dass sich Tumore besser an ihrer Umgebung anpassen können. Dadurch werden sie aggressiver und schlechter behandelbar. Turner *et al.* beobachteten außerdem, dass die Amplifikation der für EGFRvIII kodierenden Gene von extrachromosomaler DNA auf chromosomale HSRs verschoben werden kann. (139) Nathanson *et al.* haben einen ähnlichen Effekt beschrieben: Sie beobachteten einen spezifischen Verlust extrachromosomaler EGFR Amplifikation nach Gabe von Tyrosinkinaseinhibitoren bis zur Resistenzbildung. In unbehandelten Zellen und in Zellen, denen nach dieser Behandlung das Therapeutikum wieder entnommen wurde, fanden sie reichlich extrachromosomale EGFR Amplifikation vor. Jedoch konnte zwischen den Zellen kein Unterschied der chromosomalen EGFR Amplifikation festgestellt werden, Markerchromosomen mit HSRs wurden in allen drei Gruppen gefunden. (263) HSRs auf Markerchromosomen könnten infolgedessen ein Reservoir für EGFR Genkopien darstellen. Tumorzellen wäre somit ermöglicht, nach einem externen Stimulus wie beispielsweise der EGF Konzentration im Medium wieder extrachromosomale EGFR Amplifikation zu erhalten. (263, 284) Dies dient als mögliche Erklärung, weshalb die EGFR Amplifikation durch die EGF Konzentration modulierbar ist.

Alle Ergebnisse der EGFR Amplifikationsanalysen von HROG33 und HROG59 via qPCR und CISH wurden durch die immunhistochemische Darstellung der EGFR Expression und durch Western Blot Analysen validiert, um die Funktionalität der EGFR Amplifikation nachzuweisen. Während IHC die EGFR Expression unter allen Konditionen korrelierend zu den qPCR Daten bestätigt, kommt es beim Western Blot zu Abweichungen. Der Western Blot des HROG33 zeigt bei Zugabe von 0 ng/ml und 1 ng/ml EGF zum serumfreien Medium nur eine schwache Bande, wobei unter diesen Konditionen eine hohe Amplifikationsrate vorgefunden wurde. Diese Ergebnisse sind mutmaßlich der Sensitivität des Western Blots, die durch hohe

Fehleranfälligkeit der einzelnen Teilschritte zustande kommt, zuzuschreiben. Des Weiteren zeigte HROG59 mit 2,5 ng/ml im serumfreien Medium kultiviert eine sehr schwach ausgeprägte Bande bei 170 kDa, was eine Abwesenheit von EGFR Protein implementiert. Diese Beobachtung ist allerdings, da bei der entsprechenden β -Actinbande bei 2,5 ng/ml im Vergleich zur β -Actinbande bei 30 ng/ml auch kein Signal detektierbar war, höchst wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Beladung zurückzuführen.

Zusätzlich zur erhöhten EGFR Amplifikation kommt es in über einem Drittel der GBM Fälle zur unter 1.2.1. beschriebenen EGFRvIII Mutation. (143) In Vorstudien wurden HROG33 PDX und HROG59 PDX auf EGFRvIII Amplifikation untersucht, HROG33 PDX wies diese auf. In der immunhistochemischen Betrachtung dieser Zelllinie wurde ersichtlich, dass der mutierte EGFRvIII nur in den Bereichen stark exprimiert wurde, in denen auch EGFR Expression vorhanden war, wie bereits durch Aldape *et al.* beobachtet. (286) Die nicht vorhandene EGFRvIII Amplifikation in HROG59 PDX wurde ebenfalls durch IHC Analyse der Zelllinie HROG59 in P10 validiert. Die Western Blots von HROG33 und HROG59 zeigten zu allen Konditionen eine Doppelbande. Der EGFR Antikörper, der bei der Western Blot Analyse neben dem EGFR auch EGFRvIII bindet, stellt zumindest für HROG33 eine mögliche Ursache dar. Weitere Erklärungen wären suboptimale Bedingungen bei der Fertigung des Western Blots, wie bspw. eine zu niedrige Verdünnung, polyklonale Antikörper, die Nebenprodukte binden und ein nicht optimierter pH-Wert. Diese Erklärungsansätze können auch zur β -Actin Doppelbande, die bei allen Zelllinien zu beobachten ist, geführt haben.

Die EGFR Amplifikation ist von der EGF Konzentration abhängig und lässt sich dementsprechend durch Änderung der Ligandenkonzentration regulieren.

Da nun vorher beobachtet wurde, dass die Zugabe von 10 ng/ml EGF und noch besser 0 ng/ml EGF im serumfreien Medium die EGFR Amplifikation erhalten können, sollte in dieser Arbeit der Prozess des EGF Einflusses genauer betrachtet werden. Es sollte beleuchtet werden, ob der Abfall der EGFR Amplifikation mit steigender EGF Konzentration einen linearen Prozess, oder ein abruptes Ereignis ab einem gewissen Sättigungsgrad des Liganden darstellt.

Bei der Untersuchung der Zelllinien deuteten die Ergebnisse zunächst darauf hin, dass die Höhe der EGF Konzentration die Kultivierung beeinflusst. Bei näherer Betrachtung der beiden Zelllinien HROG33 und HROG59 durch qPCR schienen niedrigere EGF Konzentrationen zu höheren EGFR Amplifikationsraten, die sich näher am Ausgangswert des Xenograft befinden, zu führen. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass geringe EGF Konzentrationen in serumfreien Medium die EGFR Amplifikation besser erhalten können, als ein gänzlicher Verzicht auf EGF oder Konzentrationen ab 10 ng/ml EGF.

Durch die Resultate der qPCR erschien die Tendenz, als ob die Zugabe von 0,5 ng/ml bis ca. 1,5 ng/ml EGF zum serumfreien Medium die Amplifikation höher ausfallen ließ, als andere Kulturkonditionen. Die CISH Analyse der EGFR Amplifikation und die immunhistochemische Betrachtung der EGFR Expression konnten diese Beobachtung nicht bestätigen, da in ihren Ergebnissen keine Unterschiede zwischen den Konditionen von 0 ng/ml bis 2,5 ng/ml EGF erkennbar waren. In der Western Blot Analyse, die zwischen den Ergebnissen der EGFR Expression insgesamt ebenfalls keine echten Unterschiede aufwies, konnte allerdings ein außerordentlich verstärktes Signal bei der 0,5 ng/ml EGF Kondition des HROG33 dargestellt werden. Um allerdings eine aussagekräftige Beurteilung treffen zu können, müssten weitere Daten in Folgestudien erhoben werden. Die Ergebnisse auf Grundlage zweier Zelllinien lassen an dieser Stelle nur Vermutungen zu. Mögliche Begründungen für die etwas verbesserten Amplifikationsraten, auch verglichen mit dem serumfreien Medium ohne EGF Zugabe, könnte sein, dass die Zellen auch in ihrer physiologischen Umgebung EGF erhalten und dieses auch benötigen. In der nicht lebensgleichen Umgebung mit sehr hohen EGF Konzentrationen scheinen die Zellen allerdings weitaus weniger dazu zu neigen, EGFR zu amplifizieren. Auch wurde in 1.2.1. beschrieben, dass die Zellen über auto- und parakrine loops in der Lage sind, selbst die Ligandenproduktion für ihren Rezeptor zu induzieren. Diese Wechselwirkungen werden auch durch die Neurosphärenbildung der Zellen begünstigt. (287) Schulte *et al.* beobachteten, dass Zellen mit erhöhter EGFR Amplifikation und Expression EGF in solchen Mengen sezernieren können, dass den Zellen ermöglicht wird, EGFR im autokrinen loop zu stimulieren. (264) Es wäre denkbar, dass die Zugabe geringer EGF Konzentration ebenfalls einen Einfluss auf diese Wechselwirkungen hat und die Eigenbildung der Liganden unter bestimmten Konditionen begünstigt. Die Betrachtung der Mechanismen der zelleigenen Ligandenproduktion wäre ebenfalls Gegenstand weiterer Folgestudien.

Eine durch hohe EGF Konzentration im serumfreien Medium abhandengekommene EGFR Amplifikation ist wieder regenerierbar.

Schulte *et al.* und Mazzoleni *et al.* hatten kontroverse Ergebnisse bei der Betrachtung der Stabilität der Zellkultur erzielt. Bei Schulte *et al.* kam es nach EGF Entzug nicht zur Erhöhung der Amplifikation, aber dafür zum Zelltod (264). Bei Mazzoleni *et al.* exprimierte eine mit 20 ng/ml kultivierte Zelllinie, nachdem sie auf 5 ng/ml EGF reduziert wurde, wieder EGFR. Er schlussfolgert daher, dass jede Zelle potenziell EGFR positiv werden kann. (265)

Um dies zu untersuchen, wurde den beiden unter Zugabe von 30 ng/ml EGF kultivierten Zelllinien, die von EGFR amplifizierenden Xenografts abstammen, nach Passage 10 für weitere 5 Passagen das EGF entzogen. Sowohl bei HROG33 als auch bei HROG59 stiegen nach nur

2 Passagen (P12) durch die Verminderung der EGF Konzentration im Medium die Werte graduell wieder an und EGFR galt als amplifiziert. CISH in P15 bestätigte die Amplifikation, die IHC Analyse die Expression des EGFR. Somit ist davon auszugehen, dass die Amplifikationsrate in den Zelllinien nicht als stabil gewertet werden kann und durch EGF Zufuhr beziehungsweise Entnahme moduliert wird. Die EGFR Amplifikation scheint somit von der EGF Konzentration im Medium abhängig zu sein. Es ist nicht hinreichend geklärt, ob die EGFR Amplifikationsraten eine Erhöhung der relativen Anzahl der EGFR Genkopien, oder eine Selektion der Subpopulation bei gleichbleibender Kopienzahl der einzelnen Zellen darstellt. Dass aber bei Entnahme von EGF nach Passage 10 die EGFR Amplifikation wieder erlangt wurde, würde dafür sprechen, dass die Subklone nicht durch externe Modulation komplett verdrängt werden können. Auch die IHC Analyse suggeriert durch das EGFR Verteilungsmuster, dass EGFR negative Zellen dazu stimuliert werden können EGFR zu exprimieren. Um also EGFR Amplifikation in hoher Kopienzahl und damit wahrscheinlich extrachromosomal in den Zellen zu erhalten, muss diese zwar bereits im Xenograft vorhanden gewesen sein, ist dann aber auch, wenn sie durch exogene Faktoren wie sehr hohe EGF Konzentration im serumfreien Medium abhandenkommt, wieder regenerierbar. Weiterhin wurde der Versuch unternommen, die in Standardmedium mit 10 % FKS kultivierte HROG33 Zelllinie nach Passage 10 in serumfreiem Medium ohne EGF zu kultivieren. Jedoch gelang keine Anpassung der Zellen an die neue Kondition. Die Proliferation stoppte und die Zellen starben ab. FKS schien somit hier die EGFR Amplifikation irreversibel zu eliminieren.

Trotz intensiver Bemühungen um die Etablierung einer personalisierten GBM Therapie ist die Erfolgsrate bis heute unbefriedigend. Ein grundsätzliches Hindernis für die Erforschung von Funktion und Wechselwirkungen der Signalwege in GBM Zellen ist ein optimales *in vitro* Modell, nahe am Primarius, ohne gentechnische Veränderungen und mit erhaltener EGFR Amplifikation.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich *in vitro* GBM Modelle mit erhaltener EGFR Amplifikation etabliert werden. Die Zelllinien wurden von zwei verschiedenen PDX angelegt, der Einfluss des EGF auf die Modulierung der EGFR Amplifikation war in beiden Fällen ähnlich. Somit konnte der Erhalt der Amplifikation bestätigt werden, die Aussagekraft über das exakte Konzentrationsoptimum ist jedoch durch die geringen Fallzahlen limitiert. Dieses Modell soll in Zukunft die Erforschung des direkten Verhaltens und der Abhängigkeit der Tumorzellen in Bezug auf den EGFR optimieren und die Basis für eine präklinische Erprobung neuer Therapien darstellen. In Folgestudien können weitere Fragestellungen erörtert werden, wie bspw. die direkte Verhaltensweise der Signalwege auf Erhöhung oder Erniedrigung der EGFR Amplifikation, die Reaktion auf Therapeutika, oder die direkte Analyse von EGFR abhängigen Effekten in einer sonst genetisch gleichen Umgebung.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Barnes B, Bertz J, Buttmann-Schweiger N, Fiebig N, Jordan S, Kraywinkel K et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. Berlin; 2016 [cited 2017 May 15]. Available from: URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf;jsessionid=31F2B85FCB0618918FBFB7E2BD681002.2_cid372?__blob=publicationFile.
2. Song KS, Phi JH, Cho B-K, Wang K-C, Lee JY, Kim DG et al. Long-term outcomes in children with glioblastoma. *J Neurosurg Pediatr* 2010; 6(2):145–9.
3. Fangusaro J. Pediatric high grade glioma: a review and update on tumor clinical characteristics and biology. *Front Oncol* 2012; 2:105.
4. McLendon RE, Robinson JS, JR, Chambers DB, Grufferman S, Burger PC. The glioblastoma multiforme in Georgia, 1977-1981. *Cancer* 1985; 56(4):894–7.
5. Kuratsu J, Takeshima H, Ushio Y. Trends in the incidence of primary intracranial tumors in Kumamoto, Japan. *Int J Clin Oncol* 2001; 6(4):183–91.
6. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 2012; 14 Suppl 5:v1-49.
7. Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol* 2012; 107(2):359–64.
8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):987–96.
9. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005; 109(1):93–108.
10. Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ et al. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* 2012; 107(1):207–12.
11. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64(19):6892–9.
12. Qaddoumi I, Sultan I, Gajjar A. Outcome and prognostic features in pediatric gliomas: a review of 6212 cases from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 2009; 115(24):5761–70.

13. Ansari M, Nasrolahi H, Kani A-A, Mohammadianpanah M, Ahmadloo N, Omidvari S et al. Pediatric glioblastoma multiforme: A single-institution experience. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2012; 33(3):155–60.
14. Borgo MCM, Pereira JLB, Lima FBF de, Brandão RACS, Carvalho GTC de, Costa BS. Glioblastoma multiforme in childhood: a case report. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; 65(9):923–5.
15. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2(9):494–503; quiz 1 p following 516.
16. Venter DJ, Bevan KL, Ludwig RL, Riley TE, Jat PS, Thomas DG et al. Retinoblastoma gene deletions in human glioblastomas. *Oncogene* 1991; 6(3):445–8.
17. Price RL. The role of cytomegalovirus in glioblastoma and rhabdomyosarcoma. [Columbus]: Ohio State University; 2012.
18. Distelmaier F, Fahsold R, Reifenberger G, Messing-Juenger M, Schaper J, Schneider DT et al. Fatal glioblastoma multiforme in a patient with neurofibromatosis type I: the dilemma of systematic medical follow-up. *Childs Nerv Syst* 2007; 23(3):343–7.
19. Huttner AJ, Kieran MW, Yao X, Cruz L, Ladner J, Quayle K et al. Clinicopathologic study of glioblastoma in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54(7):890–6.
20. Broekman MLD, Risselada R, Engelen-Lee J, Spliet WGM, Verweij BH. Glioblastoma multiforme in the posterior cranial fossa in a patient with neurofibromatosis type I. *Case Rep Med* 2009; 2009:757898.
21. Grips E, Wentzensen N, Sutter C, Sedlacek O, Gebert J, Weigel R et al. Glioblastoma multiforme als Manifestation des Turcot-Syndroms. *Der Nervenarzt* 2002; 73(2):177–82.
22. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh R-F, Xiao Y, Decker PA et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nature Genetics* 2009; 41(8):905–8.
23. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; 170(5):1445–53.
24. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(6):539–43.
25. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T et al. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2004; 85(2):165–75.

26. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114(2):97–109.
27. Radner H, Blümcke I, Reifenberger G, Wiestler O. Die neue WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems 2000. *Der Pathologe* 2002; 23(4):260–83.
28. Pollo B. Neuropathological diagnosis of brain tumours. *Neurol Sci* 2011; 32 Suppl 2:S209–11.
29. Creutzig U. ZNS-Tumoren im Kindes- und Jugendalter: Leitsymptome und Diagnostik; 2016 [cited 2017 May 15]. Available from: URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-022.html>.
30. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1999; 1(1):44–51.
31. Wiestler OD, Schmidt MC, Deimling A von, Reifenberger G, Deckert-Schluter M, Radner H et al. New developments and controversies in the neuropathology of malignant gliomas. *Front Radiat Ther Oncol* 1999; 33:123–38.
32. Rudoler S, Corn BW, Werner-Wasik M, Flanders A, Preston PE, Tupchong L et al. Patterns of tumor progression after radiotherapy for low-grade gliomas: analysis from the computed tomography/magnetic resonance imaging era. *Am J Clin Oncol* 1998; 21(1):23–7.
33. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF Receptor and p53 Mutations are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas. *Brain Pathology* 1996; 6(3):217–23.
34. Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: Multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends in Genetics* 1995; 11(10):412–5.
35. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9(3):157–73.
36. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17(1):98–110.
37. Bartek J, Ng K, Fischer W, Carter B, Chen CC. Key concepts in glioblastoma therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83(7):753–60.
38. Thomas C. Spezielle Pathologie. Stuttgart: Schattauer; 1996.

39. Hadjipanayis CG, van Meir EG. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* 2009; 15(11):519–30.
40. Weller M. Gliome: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Berlin; 2015 [cited 2017 May 15]. Available from: URL: http://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2014/PDFs_Download/030099_DGN_LL_Gliome_final.pdf.
41. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol* 2014; 16(7):896–913.
42. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* 2004; 82(10):656–70.
43. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; 21(21):2683–710.
44. Holmen SL, Williams BO. Essential role for Ras signaling in glioblastoma maintenance. *Cancer Res* 2005; 65(18):8250–5.
45. Knobbe CB, Reifenberger J, Reifenberger G. Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas. *Acta Neuropathol* 2004; 108(6):467–70.
46. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N et al. PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(16):1246–56.
47. Weller M, Pfister SM, Wick W, Hegi ME, Reifenberger G, Stupp R. Molecular neuro-oncology in clinical practice: A new horizon. *The Lancet Oncology* 2013; 14(9):e370–e379.
48. Freije WA. Gene Expression Profiling of Gliomas Strongly Predicts Survival. *Cancer Res* 2004; 64(18):6503–10.
49. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360(8):765–73.
50. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, Tribolet N de, Weller M et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):997–1003.
51. Weller M, Tabatabai G, Kastner B, Felsberg J, Steinbach JP, Wick A et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res* 2015; 21(9):2057–64.
52. Krams M, Frahm SO, Kellner U. Kurzlehrbuch Pathologie. Stuttgart: Thieme; 2010.

53. Berlit P. Basiswissen Neurologie. 5., überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007.
54. Berlit P. Klinische Neurologie. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2013.
55. Roth JG, Elvidge AR. Glioblastoma multiforme: a clinical survey. J Neurosurg 1960; 17:736–50.
56. Frankel SA, German WJ. Glioblastoma multiforme; review of 219 cases with regard to natural history, pathology, diagnostic methods, and treatment. J Neurosurg 1958; 15(5):489–503.
57. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. The Lancet Oncology 2009; 10(5):459–66.
58. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. The Lancet Oncology 2006; 7(5):392–401.
59. Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. Cochrane Database Syst Rev 2013; (4):CD007415.
60. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: A systematic review. Radiotherapy and Oncology 2002; 64(3):259–73.
61. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: The Nordic randomised, phase 3 trial. The Lancet Oncology 2012; 13(9):916–26.
62. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The NOA-08 randomised, phase 3 trial. The Lancet Oncology 2012; 13(7):707–15.
63. Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M et al. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. Neuro Oncol 2012; 14 Suppl 4:iv100-8.
64. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. Int J Cancer 2011; 129(3):659–70.

65. Imperato JP, Paleologos NA, Vick NA. Effects of treatment on long-term survivors with malignant astrocytomas. *Ann Neurol* 1990; 28(6):818–22.
66. Combs SE, Widmer V, Thilmann C, Hof H, Debus J, Schulz-Ertner D. Stereotactic radiosurgery (SRS): treatment option for recurrent glioblastoma multiforme (GBM). *Cancer* 2005; 104(10):2168–73.
67. Fogh SE, Andrews DW, Glass J, Curran W, Glass C, Champ C et al. Hypofractionated stereotactic radiation therapy: an effective therapy for recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol* 2010; 28(18):3048–53.
68. Brada M, Stenning S, Gabe R, Thompson LC, Levy D, Rampling R et al. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol* 2010; 28(30):4601–8.
69. Barbagallo GMV, Jenkinson MD, Brodbelt AR. 'Recurrent' glioblastoma multiforme, when should we reoperate? *Br J Neurosurg* 2008; 22(3):452–5.
70. Park JK, Hodges T, Arko L, Shen M, Dello Iacono D, McNabb A et al. Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2010; 28(24):3838–43.
71. Roa W, Brasher PMA, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2004; 22(9):1583–8.
72. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med* 2007; 356(15):1527–35.
73. Hankemeier UB, Schüle-Hein K, Krizanits FH. Tumorschmerztherapie. 2., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2001.
74. Paff M, Alexandru-Abrams D, Hsu FPK, Bota DA. The evolution of the EGFRvIII (rindopepimut) immunotherapy for glioblastoma multiforme patients. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(11):3322–31.
75. Iwamoto FM, Lamborn KR, Robins HI, Mehta MP, Chang SM, Butowski NA et al. Phase II trial of pazopanib (GW786034), an oral multi-targeted angiogenesis inhibitor, for adults with recurrent glioblastoma (North American Brain Tumor Consortium Study 06-02). *Neuro Oncol* 2010; 12(8):855–61.
76. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2006; 66(16):7843–8.

77. Brandes AA, Stupp R, Hau P, Lacombe D, Gorlia T, Tosoni A et al. EORTC study 26041-22041: phase I/II study on concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK) in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer* 2010; 46(2):348–54.
78. Kozin SV, Kamoun WS, Huang Y, Dawson MR, Jain RK, Duda DG. Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation. *Cancer Res* 2010; 70(14):5679–85.
79. Sharma PS, Sharma R, Tyagi T. VEGF/VEGFR pathway inhibitors as anti-angiogenic agents: present and future. *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11(5):624–53.
80. Reardon DA, Turner S, Peters KB, Desjardins A, Gururangan S, Sampson JH et al. A review of VEGF/VEGFR-targeted therapeutics for recurrent glioblastoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9(4):414–27.
81. Carra E, Barbieri F, Marubbi D, Pattarozzi A, Favoni RE, Florio T et al. Sorafenib selectively depletes human glioblastoma tumor-initiating cells from primary cultures. *Cell Cycle* 2013; 12(3):491–500.
82. Hainsworth JD, Ervin T, Friedman E, Priego V, Murphy PB, Clark BL et al. Concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and sorafenib in the first-line treatment of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 2010; 116(15):3663–9.
83. Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B, Nabors LB, Campone M, Wick A et al. Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2013; 31(26):3212–8.
84. Batchelor TT, Sorensen AG, Di Tomaso E, Zhang W-T, Duda DG, Cohen KS et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 2007; 11(1):83–95.
85. Di Tomaso E, Snuderl M, Kamoun WS, Duda DG, Auluck PK, Fazlollahi L et al. Glioblastoma recurrence after cediranib therapy in patients: lack of "rebound" revascularization as mode of escape. *Cancer Res* 2011; 71(1):19–28.
86. Lassman AB, Pugh SL, Gilbert MR, Aldape KD, Geinoz S, Beumer JH et al. Phase 2 trial of dasatinib in target-selected patients with recurrent glioblastoma (RTOG 0627). *Neuro Oncol* 2015; 17(7):992–8.
87. Kreisl TN, Smith P, Sul J, Salgado C, Iwamoto FM, Shih JH et al. Continuous daily sunitinib for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2013; 111(1):41–8.

88. Bai R-Y, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med* 2011; 17(6):301–12.
89. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(8):671–88.
90. Wang H, Xu T, Jiang Y, Xu H, Yan Y, Fu D et al. The Challenges and the Promise of Molecular Targeted Therapy in Malignant Gliomas¹. *Neoplasia* 2015; 17(3):239–55.
91. Wang MY, Lu KV, Zhu S, Dia EQ, Vivanco I, Shackleford GM et al. Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells. *Cancer Res* 2006; 66(16):7864–9.
92. Wang N, Jain RK, Batchelor TT. New Directions in Anti-Angiogenic Therapy for Glioblastoma. *Neurotherapeutics* 2017.
93. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong Y-K et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2014; 15(10):1100–8.
94. Tabatabai G, Tonn J-C, Stupp R, Weller M. The role of integrins in glioma biology and anti-glioma therapies. *Curr Pharm Des* 2011; 17(23):2402–10.
95. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW, JR, Holmgren E, Benjamin R et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(3):843–50.
96. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362(6423):841–4.
97. Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Fujii K, Yoshida K, Inoue S et al. Bimodal anti-glioma mechanisms of cilengitide demonstrated by novel invasive glioma models. *Neuropathology* 2013; 33(2):162–74.
98. Scaringi C, Minniti G, Caporello P, Enrici RM. Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results. *Anticancer Res* 2012; 32(10):4213–23.
99. Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010.
100. Aguilar LK, Arvizu M, Aguilar-Cordova E, Chiocca EA. The spectrum of vaccine therapies for patients with glioblastoma multiforme. *Curr Treat Options Oncol* 2012; 13(4):437–50.

101. Yamanaka R. Cell- and peptide-based immunotherapeutic approaches for glioma. *Trends Mol Med* 2008; 14(5):228–35.
102. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med* 2016; 375(26):2561–9.
103. Debinski W, Gibo DM, Hulet SW, Connor JR, Gillespie GY. Receptor for interleukin 13 is a marker and therapeutic target for human high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5(5):985–90.
104. Thaci B, Brown CE, Binello E, Werbaneth K, Sampath P, Sengupta S. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma therapy. *Neuro Oncol* 2014; 16(10):1304–12.
105. Hasselbalch B, Lassen U, Hansen S, Holmberg M, Sorensen M, Kosteljanetz M et al. Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial. *Neuro Oncol* 2010; 12(5):508–16.
106. Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL et al. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(1):133–42.
107. van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MCM, Kros JM, Carpentier AF et al. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol* 2009; 27(8):1268–74.
108. Ganten D, Ruckpaul K, Köhrle J, Adamski J, editors. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. Berlin: Springer; 2006. (Molekulare Medizin).
109. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(14):7709–12.
110. Arand M. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. 1. Aufl. München: Urban & Fischer; 2009.
111. Liu P, Cleveland TE, 4th., Bouyain S, Byrne PO, Longo PA, Leahy DJ. A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(27):10861–6.
112. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Gatto GJ. *Biochemie*. 7. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2013.
113. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19(13):3159–67.
114. Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 1999; 447(2-3):227–31.

115. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11):876–85.
116. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, JR. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994; 264(5155):95–8.
117. Park O, Schaefer T, Nathans D. In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(24):13704–8.
118. David M, Wong L, Flavell R, Thompson SA, Wells A, Larner AC et al. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem* 1996; 271(16):9185–8.
119. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:515–41.
120. Dancey JE, Freidlin B. Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet* 2003; 362(9377):62–4.
121. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2):127–37.
122. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M et al. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 1997; 390(6655):91–6.
123. Kristof AS, Marks-Konczalik J, Billings E, Moss J. Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* 2003; 278(36):33637–44.
124. Wells A, Gupta K, Chang P, Swindle S, Glading A, Shiraha H. Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts. *Microsc. Res. Tech.* 1998; 43(5):395–411.
125. Kari C, Chan TO, Quadros MRd, Rodeck U. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer. *Cancer Res* 2003; 63(1):1–5.
126. Woodburn J. The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Inhibition in Cancer Therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 1999; 82(2-3):241–50.
127. Wong RWC, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(2-3):147–56.

128. Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12(24):7261–70.
129. Kohsaka S, Tanak S. Chemotherapeutic Agent for Glioma. In: Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Chimelli L, Neder L, Reis RM, editors. *Pilocytic Astrocytoma: Anatomic, Pathological and Molecular Aspects*: INTECH Open Access Publisher; 2013.
130. Tang P, Steck PA, Yung WK. The autocrine loop of TGF- α /EGFR and brain tumors. *J Neurooncol* 1997; 35(3):303–14.
131. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 2007; 113(3):295–302.
132. Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, Bigner SH, Bigner DD, Laerum OD. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* 1990; 50(18):6039–44.
133. Talasila KM, Soentgerath A, Euskirchen P, Rosland GV, Wang J, Huszthy PC et al. EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathol* 2013; 125(5):683–98.
134. Barker PE. Double minutes in human tumor cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 5(1):81–94.
135. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Friedman HS, Werner MH, Bigner DD et al. Amplification and Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Glioma Xenografts. *Cancer Res* 1988; 48(8):2231–8.
136. Vogt N, Lefevre S-H, Apiou F, Dutrillaux A-M, Cor A, Leuraud P et al. Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(31):11368–73.
137. Lundberg G, Rosengren AH, Håkanson U, Stewénus H, Jin Y, Stewénus Y et al. Binomial Mitotic Segregation of MYCN-Carrying Double Minutes in Neuroblastoma Illustrates the Role of Randomness in Oncogene Amplification. *PLoS One* 2008; 3(8):e3099.
138. Sanborn JZ, Salama SR, Grifford M, Brennan CW, Mikkelsen T, Jhanwar S et al. Double minute chromosomes in glioblastoma multiforme are revealed by precise reconstruction of oncogenic amplicons. *Cancer Res* 2013; 73(19):6036–45.
139. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, Koga T, Rusert J, Lee C et al. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature* 2017; 543(7643):122–5.
-

140. Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, Varella-Garcia M. Glioblastomas in the older old. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129(5):624–31.
141. Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res* 2003; 63(2):413–6.
142. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64(6):479–89.
143. Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med* 2005; 3:38.
144. Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jensen RL. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14(1):91–6.
145. Hegi ME, Rajakannu P, Weller M. Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Curr Opin Neurol* 2012; 25(6):774–9.
146. Luwor RB, Zhu H-J, Walker F, Vitali AA, Perera RM, Burgess AW et al. The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. *Oncogene* 2004; 23(36):6095–104.
147. Li B, Yuan M, Kim I-A, Chang C-M, Bernhard EJ, Shu H-KG. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene* 2004; 23(26):4594–602.
148. Boockvar JA, Kapitonov D, Kapoor G, Schouten J, Counelis GJ, Bogler O et al. Constitutive EGFR signaling confers a motile phenotype to neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24(4):1116–30.
149. Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer* 2006; 107(6):1207–18.
150. Schulte A, Liffers K, Kathagen A, Riethdorf S, Zapf S, Merlo A et al. Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110delta. *Neuro Oncol* 2013; 15(10):1289–301.

151. Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* 2002; 62(12):3335–9.
152. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* 2011; 20(6):810–7.
153. Westermarck B, Nister M. Molecular genetics of human glioma. *Curr Opin Oncol* 1995; 7(3):220–5.
154. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(7):2965–9.
155. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 1985; 313(5998):144–7.
156. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(16):7727–31.
157. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, Friedman HS et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995; 6(10):1251–9.
158. Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, Huang HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996; 56(21):5079–86.
159. Pedersen MW, Tkach V, Pedersen N, Berezin V, Poulsen HS. Expression of a naturally occurring constitutively active variant of the epidermal growth factor receptor in mouse fibroblasts increases motility. *Int J Cancer* 2004; 108(5):643–53.
160. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 2003; 63(20):6962–70.
161. Schlegel J, Stumm G, Brande K, Merdes A, Mechttersheimer G, Hynes NE et al. Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol* 1994; 22(3):201–7.

162. Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, Milanezi F, Basto D, Pardal F et al. Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res* 2008; 28(2A):913–20.
163. Suri V, Das P, Pathak P, Jain A, Sharma MC, Borkar SA et al. Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol* 2009; 11(3):274–80.
164. Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H, Newcomb EW. Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol* 2000; 10(2):249–59.
165. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000; 60(5):1383–7.
166. Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP et al. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 1994; 9(8):2313–20.
167. Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J* 2013; 280(21):5350–70.
168. Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Mark J, Friedman HS et al. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 1990; 50(24):8017–22.
169. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87(21):8602–6.
170. Johns TG, Perera RM, Vernes SC, Vitali AA, Cao DX, Cavenee WK et al. The efficacy of epidermal growth factor receptor-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status, and heterodimerization. *Clin Cancer Res* 2007; 13(6):1911–25.
171. Schmidt MHH, Furnari FB, Cavenee WK, Bogler O. Epidermal growth factor receptor signaling intensity determines intracellular protein interactions, ubiquitination, and internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(11):6505–10.
172. Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 2003; 284(1):78–88.
-

173. Heimberger AB, Hlatky R, Suki D, Yang D, Weinberg J, Gilbert M et al. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4):1462–6.
174. Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, Kolm P, El-Mahdi AM. Epidermal growth factor receptor: An independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 1996; 34(4):809–15.
175. Prigent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, Feramisco JR et al. Enhanced Tumor-igenic Behavior of Glioblastoma Cells Expressing a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Is Mediated through the Ras-Shc-Grb2 Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(41):25639–45.
176. Lorimer IA, Lavictoire SJ. Activation of extracellular-regulated kinases by normal and mutant EGF receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2001; 1538(1):1–9.
177. Zhan Y, O'Rourke DM. SHP-2-dependent mitogen-activated protein kinase activation regulates EGFRvIII but not wild-type epidermal growth factor receptor phosphorylation and glioblastoma cell survival. *Cancer Res* 2004; 64(22):8292–8.
178. Antonyak MA, Kenyon LC, Godwin AK, James DC, Emlet DR, Okamoto I et al. Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors. *Oncogene* 2002; 21(33):5038–46.
179. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997; 272(5):2927–35.
180. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10(5):619–24.
181. Bonavia R, Inda MM, Vandenberg S, Cheng S-Y, Nagane M, Hadwiger P et al. EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF-kappaB, interleukin-8 pathway. *Oncogene* 2012; 31(36):4054–66.
182. Katanasaka Y, Kodera Y, Kitamura Y, Morimoto T, Tamura T, Koizumi F. Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. *Mol Cancer* 2013; 12:31.

183. Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991; 51(8):2164–72.
184. Mishima K, Higashiyama S, Asai A, Yamaoka K, Nagashima Y, Taniguchi N et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates mitogenic signaling and is highly expressed in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 1998; 96(4):322–8.
185. Ramnarain DB, Park S, Lee DY, Hatanpaa KJ, Scoggin SO, Otu H et al. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res* 2006; 66(2):867–74.
186. Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 1980; 303(15):878–80.
187. Di Marco E, Pierce JH, Fleming TP, Kraus MH, Molloy CJ, Aaronson SA et al. Autocrine interaction between TGF alpha and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1989; 4(7):831–8.
188. Tsao MS, Zhu H, Viallet J. Autocrine growth loop of the epidermal growth factor receptor in normal and immortalized human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res* 1996; 223(2):268–73.
189. Schwab M. *Encyclopedia of Cancer*. 3rd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
190. Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Herndon JE2 et al. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2010; 96(2):219–30.
191. Peereboom DM, Shepard DR, Ahluwalia MS, Brewer CJ, Agarwal N, Stevens GHJ et al. Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2010; 98(1):93–9.
192. Prados MD, Chang SM, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H et al. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* 2009; 27(4):579–84.
193. Groot JF de, Gilbert MR, Aldape K, Hess KR, Hanna TA, Ictech S et al. Phase II study of carboplatin and erlotinib (Tarceva, OSI-774) in patients with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2008; 90(1):89–97.

194. Yung WKA, Vredenburgh JJ, Cloughesy TF, Nghiemphu P, Klencke B, Gilbert MR et al. Safety and efficacy of erlotinib in first-relapse glioblastoma: a phase II open-label study. *Neuro Oncol* 2010; 12(10):1061–70.
195. Wen PY, Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG, Norden AD, Cloughesy TF et al. Phase I/II study of erlotinib and temsirolimus for patients with recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium trial 04-02. *Neuro Oncol* 2014; 16(4):567–78.
196. Vries NA de, Buckle T, Zhao J, Beijnen JH, Schellens JHM, van Tellingen O. Restricted brain penetration of the tyrosine kinase inhibitor erlotinib due to the drug transporters P-gp and BCRP. *Invest New Drugs* 2012; 30(2):443–9.
197. Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG et al. A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro Oncol* 2010; 12(1):95–103.
198. Brown PD, Krishnan S, Sarkaria JN, Wu W, Jaeckle KA, Uhm JH et al. Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J Clin Oncol* 2008; 26(34):5603–9.
199. Lassman AB, Rossi MR, Raizer JJ, Abrey LE, Lieberman FS, Greife CN et al. Molecular study of malignant gliomas treated with epidermal growth factor receptor inhibitors: tissue analysis from North American Brain Tumor Consortium Trials 01-03 and 00-01. *Clin Cancer Res* 2005; 11(21):7841–50.
200. Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC et al. Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 80(2):347–53.
201. Prados MD, Yung WKA, Wen PY, Junck L, Cloughesy T, Fink K et al. Phase-1 trial of gefitinib and temozolomide in patients with malignant glioma: a North American brain tumor consortium study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61(6):1059–67.
202. Hegi ME, Diserens A-C, Bady P, Kamoshima Y, Kouwenhoven MCM, Delorenzi M et al. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(6):1102–12.
203. Vivanco I, Robins HI, Rohle D, Campos C, Grommes C, Nghiemphu PL et al. Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2012; 2(5):458–71.

204. Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Mischel PS. PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2007; 13(2 Pt 1):378–81.
205. Griffero F, Daga A, Marubbi D, Capra MC, Melotti A, Pattarozzi A et al. Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2009; 284(11):7138–48.
206. Study of Tesevatinib Monotherapy in Patients With Recurrent Glioblastoma; 2017 [cited 2017 May 15]. Available from: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02844439?term=glioblastoma&recr=Open&rank=6>.
207. Gajdosik Z. Tesevatinib. Tyrosine kinase inhibitor, Non-small cell lung cancer therapy, Treatment of glioblastoma, Treatment of polycystic kidney disease. *Drugs Fut* 2016; 41(6):353.
208. Neyns B, Sadones J, Joosens E, Bouttens F, Verbeke L, Baurain J-F et al. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol* 2009; 20(9):1596–603.
209. Taylor TE, Furnari FB, Cavenee WK. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12(3):197–209.
210. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(5):317–27.
211. Liu J, Hu J, Cheng L, Ren W, Yang M, Liu B et al. Biomarkers predicting resistance to epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer with wild-type KRAS. *Onco Targets Ther* 2016; 9:557–65.
212. Sampson JH, Crotty LE, Lee S, Archer GE, Ashley DM, Wikstrand CJ et al. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13):7503–8.
213. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, Kurpad SN et al. Monoclonal Antibodies against EGFRvIII Are Tumor Specific and React with Breast and Lung Carcinomas and Malignant Gliomas. *Cancer Res* 1995; 55(14):3140–8.
214. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(11):4207–11.
215. Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJS, Collins VP, Coplan K, Iversen K et al. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(2):639–44.

216. Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res* 2001; 61(14):5355–61.
217. Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA et al. Growth Suppression of Intracranial Xenografted Glioblastomas Overexpressing Mutant Epidermal Growth Factor Receptors by Systemic Administration of Monoclonal Antibody (mAb) 806, a Novel Monoclonal Antibody Directed to the Receptor. *Cancer Res* 2001; 61(14):5349–54.
218. Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone Marrow-generated Dendritic Cells Pulsed with Tumor Extracts or Tumor RNA Induce Antitumor Immunity against Central Nervous System Tumors. *J Exp Med* 1997; 186(7):1177–82.
219. Porgador A, Snyder D, Gilboa E. Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 1996; 156(8):2918–26.
220. Scott AM, Lee F-T, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z et al. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(10):4071–6.
221. Sampson JH, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, Herndon JE2, Lally-Goss D et al. An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(10):2773–9.
222. Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010; 28(31):4722–9.
223. Sampson JH, Aldape KD, Archer GE, Coan A, Desjardins A, Friedman AH et al. Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol* 2011; 13(3):324–33.
224. Swartz AM, Li Q-J, Sampson JH. Rindopepimut: a promising immunotherapeutic for the treatment of glioblastoma multiforme. *Immunotherapy* 2014; 6(6):679–90.
225. Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res* 2006; 16(2):126–33.

226. Schuster J, Lai RK, Recht LD, Reardon DA, Paleologos NA, Groves MD et al. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro Oncol* 2015; 17(6):854–61.
227. Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Gan HK, Murone C, Ahlqvist M et al. Treatment of human tumor xenografts with monoclonal antibody 806 in combination with a prototypical epidermal growth factor receptor-specific antibody generates enhanced antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2005; 11(17):6390–9.
228. Reardon DA, Desjardins A, Schuster J, Tran DD, Fink KL, Nabors LB et al. IMCT-08Re-ACT: long-term survival from a randomized phase II study of rindopepimut (CDX-110) plus Bevacizumab in relapsed Glioblastoma. *Neuro Oncol* 2015; 17(suppl 5):v109.1-v109.
229. Inman S. Rindopepimut Misses OS Endpoint in Phase III Glioblastoma Trial; 2016 [cited 2017 May 15]. Available from: URL: <http://www.onclive.com/web-exclusives/rindopepimut-misses-os-endpoint-in-phase-iii-glioblastoma-trial>.
230. Steinbach JP. Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Protects Human Malignant Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death. *Cancer Res* 2004; 64(5):1575–8.
231. Khachigian LM, Field SL, Crouch R, Chesterman CN. Platelet-derived growth factor A-chain synthetic peptide inhibits human glioma xenograft proliferation in nude mice. *Anticancer Res* 1995; 15(2):337–41.
232. Kondo S, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* 1998; 16(25):3323–30.
233. Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen A-J et al. Pten and p53 converge on c-Myc to control differentiation, self-renewal, and transformation of normal and neoplastic stem cells in glioblastoma. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73:427–37.
234. Damia G, D'Incalci M. Contemporary pre-clinical development of anticancer agents--what are the optimal preclinical models? *Eur J Cancer* 2009; 45(16):2768–81.
235. Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1551(1):M19-27.
236. Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, Tamaoki N, Kawamoto T, Taniguchi S et al. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 1988; 8(4):1816–20.
237. Malden LT, Novak U, Kaye AH, Burgess AW. Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1988; 48(10):2711–4.

238. Cook N, Jodrell DI, Tuveson DA. Predictive in vivo animal models and translation to clinical trials. *Drug Discov Today* 2012; 17(5-6):253–60.
239. Jung J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicol Res* 2014; 30(1):1–5.
240. Liffers K, Lamszus K, Schulte A. EGFR Amplification and Glioblastoma Stem-Like Cells. *Stem Cells Int* 2015; 2015:427518.
241. Stockhausen M-T, Broholm H, Villingshoj M, Kirchhoff M, Gerdes T, Kristoffersen K et al. Maintenance of EGFR and EGFRvIII expressions in an in vivo and in vitro model of human glioblastoma multiforme. *Exp Cell Res* 2011; 317(11):1513–26.
242. Weinstein JN. Drug discovery: Cell lines battle cancer. *Nature* 2012; 483(7391):544–5.
243. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R et al. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6):568–80.
244. Martens T, Laabs Y, Gunther HS, Kemming D, Zhu Z, Witte L et al. Inhibition of glioblastoma growth in a highly invasive nude mouse model can be achieved by targeting epidermal growth factor receptor but not vascular endothelial growth factor receptor-2. *Clin Cancer Res* 2008; 14(17):5447–58.
245. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006; 9(5):391–403.
246. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002; 39(3):193–206.
247. Podergajs N, Brekka N, Radlwimmer B, Herold-Mende C, Talasila KM, Tiemann K et al. Expansive growth of two glioblastoma stem-like cell lines is mediated by bFGF and not by EGF. *Radiol Oncol* 2013; 47(4):330–7.
248. Schulte A, Gunther HS, Phillips HS, Kemming D, Martens T, Kharbanda S et al. A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. *Glia* 2011; 59(4):590–602.
249. Fael Al-Mayhany TM, Ball SLR, Zhao J-W, Fawcett J, Ichimura K, Collins PV et al. An efficient method for derivation and propagation of glioblastoma cell lines that conserves the molecular profile of their original tumours. *J Neurosci Methods* 2009; 176(2):192–9.

250. Witt Hamer PC de, van Tilborg AAG, Eijk PP, Sminia P, Troost D, van Noorden CJF et al. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene* 2008; 27(14):2091–6.
251. Soeda A, Inagaki A, Oka N, Ikegame Y, Aoki H, Yoshimura S-I et al. Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol Chem* 2008; 283(16):10958–66.
252. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R et al. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 2008; 27(20):2897–909.
253. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(25):15178–83.
254. Maier WF, Stowe K, Sieg S. Combinatorial and high-throughput materials science. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46(32):6016–67.
255. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, Vitis S de et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64(19):7011–21.
256. Stoczynska-Fidelus E, Piaskowski S, Bienkowski M, Banaszczyk M, Hulas-Bigoszewska K, Winięcka-Klimek M et al. The failure in the stabilization of glioblastoma-derived cell lines: spontaneous in vitro senescence as the main culprit. *PLoS One* 2014; 9(1):e87136.
257. Pandita A, Aldape KD, Zadeh G, Guha A, James CD. Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39(1):29–36.
258. Filmus J, Pollak MN, Cairncross JG, Buick RN. Amplified, overexpressed and rearranged epidermal growth factor receptor gene in a human astrocytoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 131(1):207–15.
259. Thomas C, Ely G, James CD, Jenkins R, Kastan M, Jedlicka A et al. Glioblastoma-related gene mutations and over-expression of functional epidermal growth factor receptors in SKMG-3 glioma cells. *Acta Neuropathol* 2001; 101(6):605–15.
260. Del Vecchio CA, Giacomini CP, Vogel H, Jensen KC, Florio T, Merlo A et al. EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene* 2013; 32(21):2670–81.

261. Padfield E, Ellis HP, Kurian KM. Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. *Front Oncol* 2015; 5:5.
262. Li L, Puliappadamba VT, Chakraborty S, Rehman A, Vemireddy V, Saha D et al. EGFR wild type antagonizes EGFRvIII-mediated activation of Met in glioblastoma. *Oncogene* 2015; 34(1):129–34.
263. Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gomez G et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* 2014; 343(6166):72–6.
264. Schulte A, Gunther HS, Martens T, Zapf S, Riethdorf S, Wulfig C et al. Glioblastoma stem-like cell lines with either maintenance or loss of high-level EGFR amplification, generated via modulation of ligand concentration. *Clin Cancer Res* 2012; 18(7):1901–13.
265. Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, Cominelli M, Franzin A, Sergi L et al. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res* 2010; 70(19):7500–13.
266. Kelly JJP, Stechishin O, Chojnacki A, Lun X, Sun B, Senger DL et al. Proliferation of human glioblastoma stem cells occurs independently of exogenous mitogens. *Stem Cells* 2009; 27(8):1722–33.
267. Eimer S, Dugay F, Airiau K, Avril T, Quillien V, Belaud-Rotureau M-A et al. Cyclopamine cooperates with EGFR inhibition to deplete stem-like cancer cells in glioblastoma-derived spheroid cultures. *Neuro Oncol* 2012; 14(12):1441–51.
268. Clark PA, Iida M, Treisman DM, Kalluri H, Ezhilan S, Zorniak M et al. Activation of multiple ERBB family receptors mediates glioblastoma cancer stem-like cell resistance to EGFR-targeted inhibition. *Neoplasia* 2012; 14(5):420–8.
269. Stec WJ, Rosiak K, Siejka P, Peciak J, Popeda M, Banaszczyk M et al. Cell line with endogenous EGFRvIII expression is a suitable model for research and drug development purposes. *Oncotarget* 2016; 7(22):31907–25.
270. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370(8):699–708.
271. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18(8):1061–83.
-

272. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 2007; 318(5848):287–90.
273. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366(10):883–92.
274. Johnson BE, Mazon T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* 2014; 343(6167):189–93.
275. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 2011; 472(7341):90–4.
276. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(10):4009–14.
277. Patane M, Porra P, Bottega E, Morosini S, Cantini G, Girgenti V et al. Frequency of NFKBIA deletions is low in glioblastomas and skewed in glioblastoma neurospheres. *Mol Cancer* 2013; 12:160.
278. Thermo Fisher Scientific (Hg.). TaqMan Assays vs. SYBR Green Dye for qPCR [cited 2017 May 15]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>.
279. William D, Mullins CS, Schneider B, Orthmann A, Lamp N, Krohn M et al. Optimized creation of glioblastoma patient derived xenografts for use in preclinical studies. *J Transl Med* 2017; 15(1):27.
280. Takei H, Nguyen Y, Mehta V, Chintagumpala M, Dauser RC, Adesina AM. Low-level copy gain versus amplification of myc oncogenes in medulloblastoma: utility in predicting prognosis and survival. *Laboratory investigation. J Neurosurg Pediatr* 2009; 3(1):61–5.
281. Barnes DW. Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. *J Cell Biol* 1982; 93(1):1–4.
282. Gulli LF, Palmer KC, Chen YQ, Reddy KB. Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ* 1996; 7(2):173–8.
283. Stark GR, Debatisse M, Giulotto E, Wahl GM. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 1989; 57(6):901–8.
-

284. Windle B, Draper BW, Yin YX, O'Gorman S, Wahl GM. A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration. *Genes Dev* 1991; 5(2):160–74.
285. Kanda T, Otter M, Wahl GM. Mitotic segregation of viral and cellular acentric extrachromosomal molecules by chromosome tethering. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 1):49–58.
286. Aldape KD, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(7):700–7.
287. Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(10):733–6.

Datenübersicht HROG33

Sample ID	RQ	RQ min	RQ max	Error down	Error up
33 P2 0 ng	28,34	26,86	29,90	1,48	1,56
33 P3 0 ng	49,82	47,98	51,74	1,84	1,91
33 P4 0 ng	67,45	39,76	114,39	27,67	46,94
33 P5 0 ng	38,00	35,76	40,40	2,24	2,40
33 P6 0 ng	36,67	35,71	37,65	0,96	0,98
33 P7 0 ng	36,56	33,60	39,77	2,95	3,21
33 P8 0 ng	41,37	32,76	52,24	8,61	10,87
33 P9 0 ng	22,72	21,71	23,79	1,02	1,06
33 P10 0 ng	21,29	18,13	25,00	3,16	3,71
33 P2 0,5 ng	27,36	23,01	32,54	4,35	5,18
33 P3 0,5 ng	46,38	42,41	50,71	3,97	4,34
33 P4 0,5 ng	41,64	39,44	43,97	2,20	2,33
33 P5 0,5 ng	33,00	29,95	36,33	3,05	3,33
33 P6 0,5 ng	34,55	31,19	38,28	3,36	3,73
33 P7 0,5 ng	23,50	19,22	28,73	4,28	5,23
33 P8 0,5 ng	37,22	32,20	43,02	5,02	5,80
33 P9 0,5 ng	24,71	17,96	34,01	6,75	9,30
33 P10 0,5 ng	42,44	40,49	44,47	1,95	2,04
33 P2 1 ng	31,35	28,32	34,69	3,02	3,35
33 P4 1 ng	9,63	9,03	10,28	0,60	0,65
33 P5 1 ng	11,98	11,36	12,63	0,62	0,65
33 P6 1 ng	18,90	18,29	19,56	0,61	0,66
33 P7 1 ng	27,24	25,22	29,42	2,02	2,18
33 P8 1 ng	28,91	27,71	30,17	1,21	1,26
33 P9 1 ng	42,43	39,20	45,93	3,23	3,50
33 P10 1 ng	36,20	34,49	37,99	1,71	1,79
33 P2 1,5 ng	22,22	20,36	24,26	1,86	2,04
33 P3 1,5 ng	18,95	16,33	21,98	2,61	3,03
33 P4 1,5 ng	15,43	13,42	17,73	2,01	2,30

33 P5 1,5 ng	39,79	33,90	46,70	5,89	6,91
33 P6 1,5 ng	9,55	8,76	10,42	0,80	0,87
33 P7 1,5 ng	20,53	19,12	22,05	1,41	1,52
33 P8 1,5 ng	47,59	44,74	50,62	2,85	3,03
33 P9 1,5 ng	51,31	40,59	64,85	10,72	13,55
33 P10 1,5 ng	39,55	37,86	41,32	1,69	1,77
33 P2 2 ng	13,77	13,01	14,58	0,76	0,81
33 P3 2 ng	44,61	38,20	52,10	6,41	7,49
33 P4 2 ng	28,47	27,66	29,30	0,81	0,83
33 P5 2 ng	33,67	27,70	40,92	5,97	7,25
33 P6 2 ng	24,26	22,69	25,94	1,57	1,68
33 P7 2 ng	25,56	23,48	27,82	2,08	2,26
33 P8 2 ng	17,71	16,46	19,05	1,25	1,34
33 P9 2 ng	21,72	19,97	23,63	1,75	1,91
33 P10 2 ng	20,25	19,53	21,00	0,72	0,76
33 P2 2,5 ng	44,11	41,10	47,35	3,01	3,24
33 P3 2,5 ng	27,00	24,65	29,55	2,35	2,55
33 P4 2,5 ng	55,22	46,34	65,80	8,88	10,58
33 P5 2,5 ng	46,60	40,97	53,03	5,63	6,43
33 P6 2,5 ng	21,80	19,64	24,19	2,16	2,39
33 P7 2,5 ng	64,15	44,87	91,70	19,27	27,55
33 P8 2,5 ng	39,00	36,47	41,78	2,53	2,78
33 P9 2,5 ng	37,54	35,53	39,67	2,01	2,13
33 P10 2,5 ng	20,46	18,45	22,69	2,01	2,23
33 P2 10 ng	23,08	22,55	23,63	0,53	0,55
33 P3 10 ng	30,43	29,09	31,83	1,34	1,40
33 P4 10 ng	18,40	16,29	20,79	2,11	2,39
33 P5 10 ng	23,85	21,58	26,37	2,27	2,52
33 P6 10 ng	12,18	11,35	13,08	0,83	0,89
33 P7 10 ng	19,55	17,74	21,54	1,81	1,99
33 P8 10 ng	12,31	9,11	16,62	3,19	4,31
33 P9 10 ng	13,26	10,09	17,42	3,17	4,16
33 P10 10 ng	7,60	7,13	8,10	0,47	0,50
33 P2 30 ng	30,09	28,40	31,88	1,69	1,79
33 P3 30 ng	24,76	22,05	27,80	2,71	3,04
33 P4 30 ng	5,41	4,15	7,05	1,26	1,64

33 P5 30 ng	7,52	7,08	7,99	0,44	0,47
33 P6 30 ng	4,93	4,39	5,53	0,54	0,60
33 P7 30 ng	3,33	3,16	3,52	0,17	0,19
33 P8 30 ng	4,12	3,47	4,89	0,65	0,77
33 P9 30 ng	3,80	3,62	4,00	0,18	0,20
33 P10 30 ng	3,30	2,49	4,38	0,81	1,08
33 P0 10 % FKS	41,76	40,87	42,66	0,89	0,90
33 P1 10 % FKS	39,16	36,26	42,30	2,90	3,13
33 P3 10 % FKS	20,25	18,55	22,11	1,70	1,86
33 P6 10 % FKS	6,27	6,05	6,49	0,22	0,23
33 P7 10 % FKS	2,46	2,31	2,61	0,14	0,15
33 P8 10 % FKS	1,86	1,78	1,95	0,08	0,09
33 P9 10 % FKS	2,71	2,36	3,11	0,35	0,40
33 P10 10 % FKS	2,26	2,09	2,44	0,17	0,18
33 P11 30→0 ng	7,70	7,16	8,29	0,55	0,59
33 P12 30→0 ng	14,90	13,89	15,99	1,01	1,08
33 P13 30→0 ng	14,95	13,80	16,19	1,15	1,24
33 P14 30→0 ng	33,67	30,88	36,71	2,79	3,04
33 P15 30→0 ng	30,19	25,70	35,46	4,49	5,27

TABELLE A: DATENÜBERSICHT HROG33

Datenübersicht HROG59

Sample ID	RQ	RQ min	RQ max	Error down	Error up
59 P2 0 ng	33,95	31,37	36,73	2,58	2,78
59 P3 0 ng	75,94	72,53	79,51	3,41	3,57
59 P4 0 ng	8,31	7,06	9,80	1,26	1,49
59 P5 0 ng	31,41	28,31	34,86	3,10	3,45
59 P6 0 ng	27,15	25,83	28,53	1,32	1,38
59 P7 0 ng	30,00	28,11	32,02	1,89	2,02
59 P8 0 ng	50,59	47,88	53,45	2,71	2,86
59 P9 0 ng	37,18	36,43	39,23	1,37	1,42
59 P10 0 ng	31,27	28,64	36,35	3,63	4,08

59 P2 0,5 ng	21,70	19,54	24,10	2,16	2,40
59 P4 0,5 ng	25,88	24,09	27,80	1,79	1,92
59 P5 0,5 ng	28,15	26,79	29,58	1,36	1,43
59 P7 0,5 ng	44,29	42,57	46,09	1,72	1,79
59 P8 0,5 ng	47,74	44,20	51,57	3,55	3,83
59 P9 0,5 ng	43,04	38,46	48,16	4,58	5,12
59 P10 0,5 ng	50,80	43,76	58,97	7,04	8,17
59 P2 1 ng	51,61	47,62	55,93	3,99	4,32
59 P3 1 ng	35,12	33,42	36,91	1,70	1,79
59 P4 1 ng	46,12	43,37	49,04	2,74	2,92
59 P6 1 ng	36,22	34,50	38,04	1,72	1,81
59 P7 1 ng	45,66	40,88	51,00	4,78	5,34
59 P8 1 ng	51,64	49,00	54,42	2,64	2,78
59 P9 1 ng	53,63	48,92	58,80	4,71	5,17
59 P10 1 ng	50,37	31,26	81,17	19,11	30,8
59 P2 1,5 ng	19,05	16,87	21,50	2,18	2,45
59 P4 1,5 ng	24,17	22,81	25,61	1,36	1,44
59 P5 1,5 ng	28,41	26,72	30,21	1,69	1,80
59 P6 1,5 ng	25,90	23,49	28,56	2,41	2,66
59 P7 1,5 ng	32,70	29,59	36,12	3,10	3,43
59 P8 1,5 ng	19,77	17,99	21,71	1,77	1,95
59 P9 1,5 ng	30,35	27,99	32,92	2,37	2,57
59 P10 1,5 ng	24,27	23,26	25,33	1,01	1,05
59 P2 2,5 ng	35,28	31,14	39,97	4,14	4,69
59 P3 2,5 ng	39,14	31,42	48,76	7,72	9,62
59 P4 2,5 ng	53,49	45,50	62,88	7,99	9,39
59 P5 2,5 ng	32,53	29,29	36,13	3,24	3,60
59 P6 2,5 ng	34,77	27,89	43,36	6,89	8,59
59 P7 2,5 ng	29,56	27,63	32,55	1,93	2,99
59 P8 2,5 ng	25,29	23,32	27,42	1,97	2,13
59 P9 2,5 ng	25,71	24,32	27,18	1,39	1,47
59 P10 2,5 ng	28,98	26,71	31,44	2,27	2,46
59 P2 10 ng	26,92	25,79	28,10	1,13	1,18
59 P3 10 ng	33,46	30,56	36,64	2,90	3,18
59 P4 10 ng	38,84	36,19	41,67	2,64	2,83
59 P5 10 ng	24,56	23,29	25,90	1,27	1,34

59 P6 10 ng	16,55	14,99	18,26	1,56	1,71
59 P8 10 ng	27,88	18,91	41,10	8,97	13,22
59 P9 10 ng	34,57	31,10	38,44	3,47	3,86
59 P10 10 ng	30,16	26,87	33,86	3,29	3,69
59 P2 30 ng	24,98	23,46	26,61	1,52	1,63
59 P3 30 ng	22,14	20,45	23,97	1,69	1,83
59 P4 30 ng	32,81	27,88	38,61	4,93	5,80
59 P5 30 ng	3,34	2,89	3,86	0,45	0,52
59 P6 30 ng	3,67	3,44	3,92	0,23	0,25
59 P7 30 ng	4,85	4,72	4,99	0,13	0,13
59 P8 30 ng	4,91	4,60	5,24	0,31	0,33
59 P9 30 ng	6,15	5,89	6,42	0,26	0,27
59 P10 30 ng	7,65	6,10	9,60	1,55	1,95
59 P1 10 % FKS	57,19	54,11	60,45	3,08	3,26
59 P2 10 % FKS	58,30	54,73	62,09	3,57	3,79
59 P11 30→0 ng	11,80	10,59	13,14	1,21	1,35
59 P12 30→0 ng	16,24	13,56	19,45	2,68	3,21
59 P13 30→0 ng	16,51	15,53	17,54	0,97	1,03
59 P14 30→0 ng	23,48	22,15	24,88	1,33	1,41
59 P15 30→0 ng	22,65	20,82	24,65	1,83	1,99

TABELLE B: DATENÜBERSICHT HROG59

Datenübersicht HROG22

Sample ID	RQ	RQ min	RQ max	Error down	Error up
22 P1 0 ng	1,88	1,79	1,97	0,09	0,09
22 P2 0 ng	1,29	1,14	1,45	0,15	0,16
22 P3 0 ng	2,26	2,08	2,46	0,18	0,20
22 P4 0 ng	1,00	0,85	1,17	0,15	0,17
22 P5 0 ng	1,10	1,00	1,22	0,10	0,12
22 P6 0 ng	1,15	1,06	1,24	0,09	0,09
22 P7 0 ng	1,21	0,34	4,29	0,87	3,08
22 P8 0 ng	2,63	2,34	2,95	0,29	0,32
22 P9 0 ng	2,97	2,48	3,56	0,49	0,59

22 P10 0 ng	1,25	0,99	1,58	0,26	0,33
22 P1 0,5 ng	1,49	1,34	1,64	0,15	0,15
22 P2 0,5 ng	1,92	1,82	2,02	0,10	0,10
22 P3 0,5 ng	1,59	1,35	1,86	0,24	0,27
22 P4 0,5 ng	1,00	0,84	1,19	0,16	0,19
22 P5 0,5 ng	1,32	1,25	1,40	0,07	0,07
22 P7 0,5 ng	1,11	1,02	1,21	0,09	0,10
22 P8 0,5 ng	1,44	1,35	1,53	0,09	0,09
22 P9 0,5 ng	2,79	2,40	3,25	0,39	0,46
22 P10 0,5 ng	3,63	2,96	4,44	0,67	0,81
22 P1 1 ng	0,90	0,80	0,94	0,10	0,04
22 P2 1 ng	1,43	1,35	1,52	0,08	0,09
22 P3 1 ng	2,58	2,40	2,77	0,18	0,20
22 P4 1 ng	0,83	0,67	1,01	0,16	0,18
22 P5 1 ng	0,89	0,85	0,93	0,04	0,04
22 P6 1 ng	1,01	0,98	1,05	0,03	0,04
22 P7 1 ng	2,01	1,54	2,63	0,47	0,62
22 P8 1 ng	2,73	2,54	2,93	0,19	0,20
22 P9 1 ng	1,90	1,44	2,50	0,45	0,60
22 P10 1 ng	1,11	1,07	1,14	0,03	0,04
22 P1 1,5 ng	1,37	1,25	1,49	0,12	0,12
22 P2 1,5 ng	1,39	1,24	1,57	0,15	0,18
22 P3 1,5 ng	1,75	1,68	1,84	0,07	0,09
22 P4 1,5 ng	0,34	0,32	0,36	0,02	0,02
22 P5 1,5 ng	2,81	2,28	3,45	0,53	0,64
22 P6 1,5 ng	1,82	1,77	1,87	0,05	0,05
22 P7 1,5 ng	1,27	1,17	1,37	0,10	0,10
22 P8 1,5 ng	1,47	1,31	1,64	0,16	0,17
22 P9 1,5 ng	1,41	1,02	1,96	0,39	0,54
22 P10 1,5 ng	3,86	3,64	4,10	0,22	0,24
22 P1 2 ng	0,42	0,41	0,43	0,01	0,01
22 P2 2 ng	1,72	1,60	1,85	0,12	0,13
22 P3 2 ng	1,71	1,59	1,84	0,12	0,13
22 P4 2 ng	0,47	0,44	0,50	0,03	0,03
22 P5 2 ng	0,99	0,84	1,17	0,15	0,18
22 P6 2 ng	1,45	1,35	1,55	0,10	0,10

22 P7 2 ng	1,28	1,21	1,35	0,07	0,07
22 P8 2 ng	1,51	0,40	5,71	1,11	4,20
22 P9 2 ng	2,12	1,69	2,66	0,43	0,54
22 P10 2 ng	1,58	1,32	1,88	0,26	0,30
22 P1 2,5 ng	0,90	0,84	0,96	0,06	0,06
22 P2 2,5 ng	2,33	2,16	2,52	0,17	0,19
22 P3 2,5 ng	1,02	0,90	1,15	0,12	0,13
22 P4 2,5 ng	0,84	0,81	0,87	0,03	0,03
22 P5 2,5 ng	0,95	0,90	0,99	0,05	0,04
22 P6 2,5 ng	2,05	1,86	2,26	0,19	0,21
22 P7 2,5 ng	2,40	2,28	2,52	0,12	0,12
22 P8 2,5 ng	1,92	1,76	2,08	0,15	0,16
22 P9 2,5 ng	1,44	1,37	1,51	0,07	0,08
22 P10 2,5 ng	2,09	1,94	2,27	0,16	0,17
22 P1 10 ng	1,67	1,49	1,86	0,18	0,19
22 P2 10 ng	1,31	1,17	1,47	0,14	0,16
22 P3 10 ng	2,01	1,88	2,15	0,13	0,14
22 P4 10 ng	3,07	2,23	4,21	0,84	1,14
22 P5 10 ng	0,94	0,89	0,99	0,05	0,05
22 P6 10 ng	1,39	1,33	1,45	0,06	0,06
22 P7 10 ng	2,90	2,68	3,14	0,22	0,24
22 P8 10 ng	1,90	1,78	2,03	0,12	0,13
22 P9 10 ng	2,46	2,35	2,59	0,12	0,13
22 P10 10 ng	1,22	1,20	1,25	0,02	0,03
22 P1 30 ng	0,60	0,49	0,73	0,11	0,13
22 P2 30 ng	0,69	0,67	0,72	0,02	0,03
22 P3 30 ng	0,90	0,65	1,23	0,25	0,33
22 P4 30 ng	0,59	0,54	0,64	0,05	0,05
22 P5 30 ng	1,40	0,97	2,02	0,43	0,62
22 P6 30 ng	0,90	0,85	0,98	0,05	0,08
22 P7 30 ng	0,90	0,82	0,98	0,08	0,08
22 P8 30 ng	2,43	1,27	4,64	1,16	2,21
22 P9 30 ng	1,93	1,37	2,72	0,56	0,79
22 P10 30 ng	1,26	0,67	2,35	0,58	1,09
22 P1 10 % FKS	1,24	1,17	1,31	0,07	0,07
22 P3 10 % FKS	1,25	1,09	1,44	0,16	0,18

22 P4 10 % FKS	1,64	1,55	1,74	0,09	0,10
22 P5 10 % FKS	1,49	1,38	1,61	0,11	0,12
22 P6 10 % FKS	2,09	1,98	2,21	0,11	0,12
22 P7 10 % FKS	2,21	2,13	2,29	0,08	0,08
22 P8 10 % FKS	1,56	1,34	1,82	0,22	0,26
22 P9 10 % FKS	1,68	1,56	1,80	0,12	0,13
22 P10 10 % FKS	1,58	1,35	1,84	0,23	0,26

TABELLE C: DATENÜBERSICHT HROG22

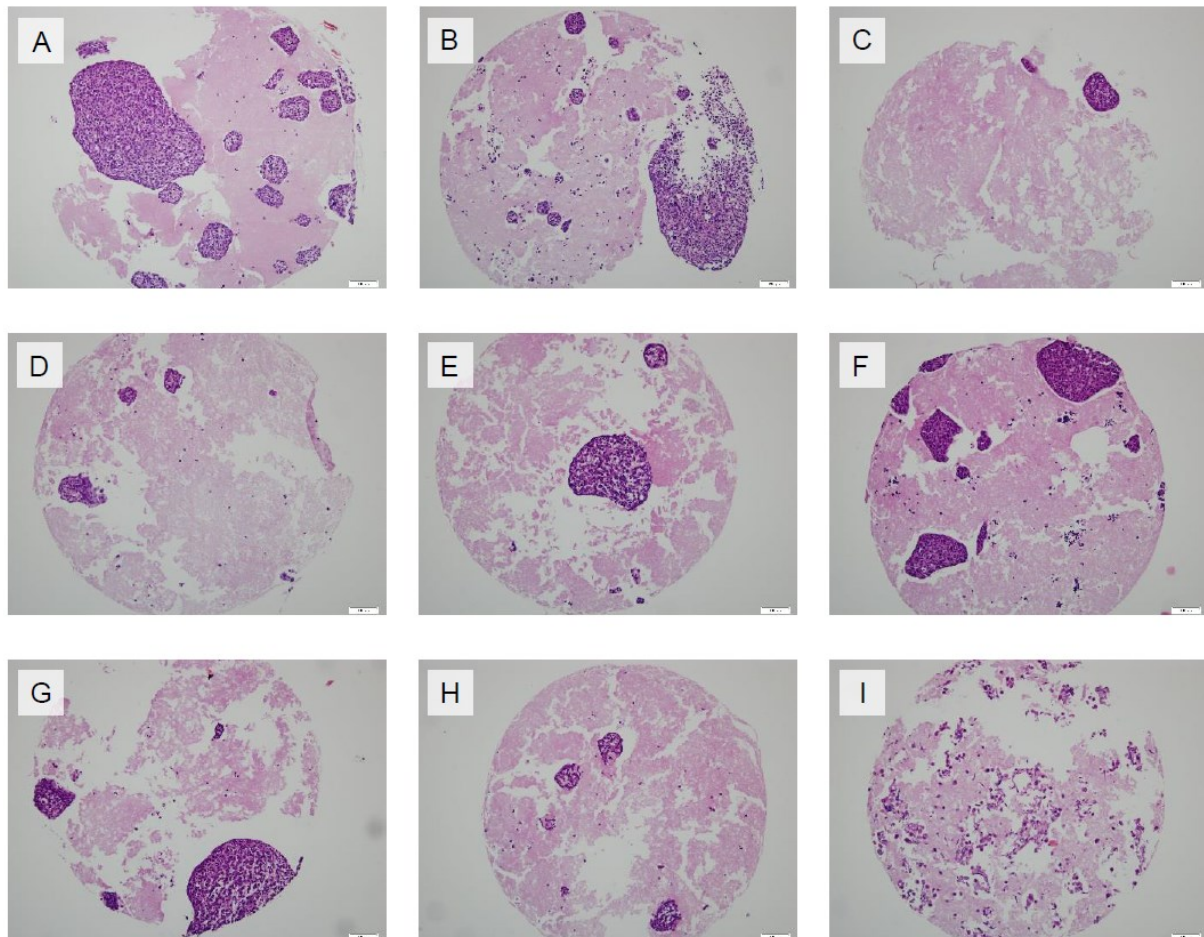
HE Schnittbilder HROG33

ABBILDUNG A: TMAs MIT HE FÄRBUNG VON HROG33 IN P10

IN SERUMFREIEM MEDIUM MIT 10 NG/ML bFGF UND 0 NG/ML EGF (A), 0,5 NG/ML EGF (B), 1 NG/ML EGF (C), 1,5 NG/ML EGF (D), 2 NG/ML EGF (E), 2,5 NG/ML EGF (F), 10 NG/ML EGF (G), 30 NG/ML EGF (H) UND IN STANDARDMEDIUM 10 % FKS (I)

- 1) Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist durch eine große inter- und intratumorale Heterogenität gekennzeichnet.
- 2) Das GBM kann EGFR positive und EGFR negative Zellen aufweisen. Eine erhöhte EGFR Amplifikation korreliert meist mit einer hohen EGFR Protein-Expression, aber bedingt diese nicht zwangsläufig.
- 3) Bei GBM Patienten werden neben der EGFR Amplifikation auch verschiedene EGFR Mutationen gefunden, die häufigste Mutation ist die EGFRvIII Mutation.
- 4) Um die Rolle des EGFR beim GBM genauer darzulegen und um adäquat an EGFR-spezifischen Therapieoptionen zu forschen, sind GBM *in vitro* Modelle vielversprechend.
- 5) Unter Standard Zellkultur wachsen GBM-Zellen adhärent am Boden der Zellkulturflasche, unter serumfreien Kultivierungsbedingungen kommt es zur Bildung von sogenannten Neurosphären, welche den GBM Primärtumor besser widerspiegeln.
- 6) Ein *in vitro*-Artefakt der Standard Zellkultur ist der schnelle Verlust der EGFR-Genamplifikation.
- 7) EGFR Amplifikation wird mit serumfreier Kultur und ohne EGF über mehrere Passagen *in vitro* erhalten.
- 8) Die EGFR Amplifikation wird im serumfreien Medium auch mit dem Zusatz von EGF in geringen Konzentrationen erhalten. Dabei ist sie von der EGF Konzentration abhängig und lässt sich durch Änderung der Ligandenkonzentration manipulieren.
- 9) Eine durch hohe EGF Konzentration im serumfreien Medium abhandengekommene EGFR Amplifikation ist wieder regenerierbar.
- 10) Die *in vitro* Kultivierung von GBM-Zellen unter modifizierten Kulturbedingungen kann keine Erhaltung der EGFR Amplifikation bedingen, wenn diese Amplifikation in dem patient derived Xenograft (PDX), aus dem die Zelllinie etabliert wurde, nicht bereits vorhanden war.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, den 15. Juni 2017



Poroshista Mokri

LEBENS LAUF

Name: Poroshista Mokri
Geburtsdatum und -ort: 13. August 1987 in Heilbronn
Wohnhaft: Skalitzer Straße 102, 10997 Berlin
Familienstand: ledig
Telefon und E-Mail: 01636148101 poroshista@gmail.com
Sprachen: Deutsch, Farsi (Muttersprachen) Englisch (fließend) Latein (Grundkenntnisse)

Ausbildung:

2008 Albert Schweitzer Gymnasium Neckarsulm, Baden Württemberg, Abitur
10/2008 - 03/2010 Auszubildende zur Gesundheits- und Krankenpflegerin, Katholische Krankenpflegeschule zu St. Hedwig, Berlin
09/2010 - 09/2011 Studium der Humanmedizin an der Universität Pécs/Ungarn
10/2011 - 09/2013 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, 1. Staatsexamen; Wahlfach „Funktionelle Neuroanatomie und Neuropsychologie“ mit der Note *sehr gut*
seit 10/2013 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock; Wahlfach „Notfallmedizin- Psychiatrische Notfälle“ mit der Note *sehr gut*

Berufserfahrung:

seit 03/2017 Honorardozentin an der Prometheus Akademie Berlin, Kurs: medizinische Untersuchungstechniken

Nebentätigkeiten:

8/2004, 8/2005, 08/2008 Ferienhilfe im pflegerischen Bereich der Vulpus Klinik GmbH, Bad Rappenau
10/2005 - 12/2007 Nachbarschaftshilfe der Sozialstation Bad Rappenau/Bad Wimpfen e.V.
10/2011 - 12/2011 Nachtwache im Neurologischen Institut, Kassel–Wilhelmshöhe
10/2014 - 04/2016 Kellnerin im Warmbad Café und Bar, Rostock

Praktika:

07/2005 Zentrum für Psychiatrie am Weißenhof, Weinsberg im Rahmen des Schulpraktikums
09/2012 Vivantes Klinikum Berlin Neukölln, Neurochirurgie einwöchige Hospitation im Rahmen der „Einführung in die klinische Medizin“
02/2014 - 03/2014 einmonatige Famulatur in der Rettungsstelle des JKB, jüdisches Krankenhaus Berlin

- 08/2014 - 09/2014 einmonatige Famulatur in der Kinderchirurgie, Kalafong Hospital, University of Pretoria, Südafrika
- 02/2015 - 03/2015 einmonatige Famulatur in der plastischen Chirurgie, Thammasat University, Bangkok, Thailand
- 07/2015 - 08/2015 15 tägige Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Herr Dr. Hueck/ Frau Saeed, Hermannstraße 52, 12049 Berlin
- 02/2015 - 03/2015 dreiwöchige Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Dr. med. Roland Krämer, Karl-Marx-Straße 27, 12043 Berlin

Forschung:

- 05/2014 - 06/2017 Promotion: „Optimierung der Glioblastoma multiforme *in vitro* Kulturbedingungen zur Erhaltung der EGFR-Amplifikation“ Doktorvater: Prof. Dr. Carl Friedrich Classen, Forschungsgruppe Hirntumorstherapie, Kinderklinik der Universitätsmedizin Rostock

Konferenzen:

- | | |
|-----------|--|
| Teilnahme | 8. Rostock Symposium for Tumor Immunology in Paediatrics, 14.-15. Februar 2014 |
| Vortrag | "Optimization of Glioblastoma multiforme <i>in vitro</i> culture conditions for preservation of EGFR gene amplification" 9. Rostock Symposium for Tumor Immunology in Paediatrics, 14.-15. Februar 2015 |
| Vortrag | "Optimization of Glioblastoma multiforme <i>in vitro</i> culture conditions for preservation of EGFR gene amplification" 10. Rostock Symposium for Tumor Immunology in Paediatrics, 19.-20. Februar 2016 |

Publikationen:

William, Doreen; **Mokri, Poroshista**; Lamp, Nora; Linnebacher, Michael; Classen, Carl Friedrich; Ebersdobler, Andreas; Schneider, Björn (2017): Amplification of the EGFR gene can be maintained and modulated by variation of EGF concentrations in in vitro models of Glioblastoma multiforme (under review)

Poster: William, D.; **Mokri, P.**; Lamp, N.; Linnebacher, M.; Classen, C.F.; Ebersdobler, A.; Schneider, B.: "Amplification of the EGFR gene can be maintained and modulated by variation of EGF concentrations in in vitro models of Glioblastoma multiforme" 13th CIMT Annual, Association for cancer immunotherapy, 11.-13. Mai 2015

Rostock, den 15.06.2017



Poroshista Mokri

DANKSAGUNG

Allen voran danke ich meinen Eltern. Ihr habt meinen Weg geebnet und jedes erdenkliche Opfer erbracht, um mir das beste Leben zu ermöglichen. Auch euch ist diese Dissertation gewidmet, mögen eure Hände niemals schmerzen.

Mein tiefster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen, meinem Doktorvater, für die Überlassung und Betreuung dieser Arbeit. Ich danke Ihnen für die Unterstützung, die differenzierten Anmerkungen, die mir einen Zugang zu dieser Thematik eröffneten und nicht zuletzt für das große Vertrauen, dass sie mir von Anfang an entgegenbrachten. Ihr Glaube an mich und meine Fähigkeiten waren meine größte Motivation. Die Ehre die mir zuteil wurde Ihre Wertschätzung zu erhalten werde ich für meine berufliche Zukunft stets als Ermutigung und Zuspruch in Erinnerung behalten.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Betreuerin Doreen William für ihre mühevollen Geduld, der umfassenden Ausbildung in jedweder Labortätigkeit und die Überlassung aller notwendigen Materialien und Dokumente. Ohne ihre engagierte und allumfassende Betreuung, die ich 24 Stunden am Tag 365 Tage im Jahr erhielt, wäre ein solcher Arbeitsumfang in dieser Zeit niemals realisierbar gewesen. Ihre wissenschaftlichen Kenntnisse und die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit haben diese maßgeblich bereichert. Die Mühe und Zeit, die sie in die Korrektur des Manuskripts investierte gaben mir Mut und Kraft zur Vervollendung meiner Dissertation.

Außerdem möchte ich ganz besonders Herrn Dr. phil. nat. Björn Schneider für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter und für die umfassenden Kooperationen danken. Er begleitete mich mit seiner langjährigen Erfahrung und seinem Wissen durch konstruktive Ratschläge und wusste stets schwierige Probleme zu lösen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, des Labors von Frau Dr. rer. nat. habil. Fischer und der AG MOI, die mein Forschungsprojekt durch Kooperationen, Ideen und Kritik bereichert haben und mir stets hilfreich zur Seite standen. Besonderer Dank gebührt hierbei Claudia Maletzki, ihre Ratschläge wusste ich immer zu schätzen.

Ich danke meinen Freunden, die mir stets Mut zugesprochen und mich bestärkt haben. Besonders danke ich Dr. med. Roger Dreyfus, ohne dessen Unterstützung ich nicht da wäre wo ich jetzt bin. Dank gilt auch Meinolf Ebbes und Martin Krogull für die Durchsicht der Dissertation und die konstruktive Kritik.

Nicht zuletzt danke ich meiner gesamten Familie. Ich danke mein Keerl, der in jeder Lebenslage mein engster Vertrauter, Ansprechpartner und Berater ist, für die unglaubliche Unterstützung und für das Verständnis. Dank gilt auch meinen Schwiegereltern, die mir wie eigene Eltern den Rücken freihielten während der Anfertigung der Dissertationsschrift.